



REC'D 24 MAR 2003

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 10 JAN. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30
www.inpi.fr

Best Available Copy



Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE **11 JAN 2002**

LIEU **75 INPI PARIS**

N° D'ENREGISTREMENT **0200319**

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE **11 JAN. 2002**

PAR L'INPI

Vos références pour ce dossier
(facultatif) **IFB 01 CE BIO MTAT**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

GROSSET-FOURNIER & DEMACHY
20, rue de Maubeuge
75009 Paris

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale

N°

Date / /

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date / /

Transformation d'une demande de
brevet européen *Demande de brevet initiale*

☐

N°

Date / /

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

MUTANTS DE LA PROTEINE TAT DU VIRUS VIH-1

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date / /

N°

Pays ou organisation

Date / /

N°

Pays ou organisation

Date / /

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

5 DEMANDEUR

☐ S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

Nom ou dénomination sociale

BIOMERIEUX SA

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Adresse

Rue

376, Chemin de l'Orme

Code postal et ville

F-69280

MARCY-L'ETOILE

Pays

FRANCE

Nationalité

FRANCAISE

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

11 JAN 2002

LIEU

75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

0200319

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

GB 510 W - 21 0497

Vos références pour ce dossier :

(facultatif)

IFB 01 CE BIO MTAT

☒ MANDATAIRE

GROSSET-FOURNIER

Nom

Chantal

Prénom

GROSSET-FOURNIER & DEMACHY

Cabinet ou Société

N° de pouvoir permanent et/ou
de lien contractuel

Adresse

Rue

20, rue de Maubeuge

Code postal et ville

75009 PARIS

N° de téléphone (facultatif)

01.42.81.09.58

N° de télécopie (facultatif)

01.42.81.08.71

Adresse électronique (facultatif)

☒ INVENTEUR (S)

Les inventeurs sont les demandeurs

☐ Oui

☒ Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée

☒ RAPPORT DE RECHERCHE

Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)

Établissement immédiat
ou établissement différé

☒

☐

Paiement échelonné de la redevance

Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques

☐ Oui

☐ Non

☒ RÉDUCTION DU TAUX
DES REDEVANCES

Uniquement pour les personnes physiques

☐ Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)
☐ Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence).

Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite»,
indiquez le nombre de pages jointes

☒ SIGNATURE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE
(Nom et qualité du signataire)

Chantal GROSSET-FOURNIER
Mandataire
422.5/PP/112

VISA DE LA PRÉFECTURE
OU DE L'INPI

MUTANTS DE LA PROTEINE TAT DU VIRUS VIH-1

La présente invention a pour objet des mutants de la protéine Tat du virus VIH-1 et un vaccin comprenant au moins un desdits mutants.

Le virus VIH est l'agent étiologique du SIDA. Le VIH appartient à la famille des rétrovirus humains (Retroviridae) et à la sous-famille des lentivirus. Parmi les deux types de VIH (VIH-1 et VIH-2), le VIH-1 est le plus cytopathique et le plus prévalent dans le monde entier, en particulier dans les pays occidentaux. L'infection par VIH-1 est accompagnée d'un dysfonctionnement immunitaire précoce chez les êtres humains infectés par le virus.

Comme les autres rétrovirus, VIH-1 a des gènes qui codent pour des protéines structurales du virus. Le gène *gag* code pour la protéine qui forme le core du virion, incluant l'antigène p24. Le gène *pol* code pour les enzymes responsables de la transcription inverse (transcriptase inverse) et de l'intégration (intégrase). Le gène *env* code pour les glycoprotéines d'enveloppe. Toutefois VIH-1 est plus complexe que les autres rétrovirus et contient six autres gènes (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu*) qui codent pour des protéines impliquées dans la régulation de l'expression des gènes du virus. Le génome du VIH-1 comprend également les LTR 5' et 3' (Long Terminal Repeat) qui comprennent des éléments de régulation impliqués dans l'expression des gènes du virus.

In vivo, Tat est une protéine nécessaire pour la réplication du VIH-1. La ou les fonction(s) de Tat dans la transcription ont grandement été étudiée(s) et il est maintenant à peu près clair qu'un des rôles principaux de Tat est la régulation de la transcription à partir du LTR 5'. Tat est un activateur de la transcription par trans-activation du LTR 5', via sa fixation à la séquence TAR en même temps qu'à d'autres facteurs cellulaires, avec pour résultante une augmentation de la transcription virale et de l'élongation. La trans-activation du LTR par la protéine Tat est essentielle à la fois pour l'expression des gènes et la réplication du virus. La trans-activation du promoteur viral par la protéine Tat (17,18) permet la production à grande échelle d'ARN messagers viraux dont le transfert dans le cytoplasme est sous la dépendance d'une autre protéine de régulation, la protéine Rev. Tat et Rev régulent l'expression du VIH-1 (7). La protéine Tat est sécrétée par les cellules infectées par le VIH-1. Une fois à l'extérieur de la cellule, elle

est capable d'être internalisée par des cellules voisines (9, 14), infectées ou non, pouvant ainsi induire des modifications de l'état d'activation de lymphocytes T non infectés. Elle est donc directement impliquée dans la progression du SIDA et probablement dans des pathologies associées au SIDA, comme le sarcome de Kaposi.

5 La protéine Tat complète est composée de 101 acides aminés, les résidus 1-72 étant codés par un premier exon et les résidus 73-101 étant codés par un deuxième exon. La protéine Tat est fortement conservée. Une forme tronquée de 86 acides aminés, qui ne correspond pas à la forme native, existe dans quelques souches de laboratoire obtenues après passages en culture. Cette forme tronquée est due à l'introduction d'un

10 codon stop à la position 87 pendant les passages en culture, mais plus de 90% des protéines Tat étudiées maintiennent la configuration de 101 acides aminés. Bien que les acides aminés 87-101 pourraient ne pas contribuer grandement à la propagation *ex vivo*, leur conservation dans les isolats naturels de VIH-1 qui se répliquent est une indication de leur importance biologique. La protéine Tat native de VIH-1 de 101 acides aminés

15 est composée de cinq domaines physiques, mais le mécanisme moléculaire par lequel elle agit n'est pas encore complètement élucidé. Brièvement, ces cinq domaines sont décrits dans la publication de Jeang, K. T et al. (18). Dans cette publication, le domaine 1 correspond aux acides aminés 1-20 riches en résidus acides, le domaine 2 correspond aux acides aminés 21-40 riches en résidus cystéine (7 résidus cystéines parmi lesquels 6

20 sont très fortement conservés), le domaine 3 correspond aux acides aminés 41-48 qui contient le motif RKGLGI commun à VIH-1, VIH-2 et SIV, le domaine 4 correspond aux acides aminés 49-72 et contient un motif basique RKKRRQRRR et le domaine 5 correspond aux acides aminés 73-101 et comprend un motif RGD. Le rôle du domaine 1 n'est pas encore élucidé. Il a seulement été montré que des changements d'un seul acide

25 aminé au niveau de ce domaine étaient bien tolérés et n'altéraient pas la fonctionnalité de la protéine Tat. Une hypothèse émise est que le domaine 1 pourrait être impliqué dans la trans-activation. Le changement de six cystéines parmi les sept dans le domaine 2 abolit la fonctionnalité de la protéine Tat. Ce domaine est important pour la transactivation. Le rôle du domaine 3 n'est pas élucidé. Le domaine 4 confère les propriétés de fixation de Tat à l'ARN TAR et est important pour la localisation

30 nucléaire ainsi que pour le transport transcellulaire de la protéine Tat. Le domaine 5 serait également impliqué dans le transport transcellulaire de la protéine Tat.

Dans la description détaillée de l'invention qui va suivre, les présents inventeurs sont partis de la séquence de la souche ACH320.2A.2.1 (n° d'accèsion NCBI U34604) et ont affiné la notion de domaines telle que donnée dans la publication de Jeang, K.T et al. (18). Ainsi et en référence à cette souche particulière, dans la présente invention le domaine 1 correspond aux acides aminés 1-21 (rôle non élucidé), le domaine 2 correspond aux acides aminés 22-37 (impliqué dans la trans-activation), le domaine 3 correspond aux acides aminés 38-48 (rôle inconnu) et le domaine 5 correspond aux acides aminés 73-101 (transport transcellulaire). Dans le domaine 4 correspondant aux acides aminés 49-72, c'est le peptide 49-57 qui est important pour la fixation à l'ARN TAR, pour la localisation nucléaire et pour le transport transcellulaire de Tat (18).

La mise au point d'un vaccin contre le VIH-1 est attendue au niveau mondial. Chez les patients infectés par le VIH-1, une réponse immune contre Tat et Rev est seulement détectée chez les personnes pour lesquelles l'infection ne progresse pas en SIDA. (26). Plusieurs études de vaccination utilisant Tat et/ou Rev dans le modèle animal VIS ont montré une protection partielle ou complète contre l'infection (4-6, 21). Cependant, la transposition directe de ces protocoles de vaccination chez l'homme n'est pas possible. Il a entre autres été montré que Tat a des effets toxiques *in vitro* (19, 22). Ces effets toxiques comprennent (i) la dérégulation de signaux cellulaires impliqués dans l'apoptose (28, 30), (ii) la dérégulation de l'expression de parties de gènes du système immunitaire tel que le gène codant pour l'interleukine-2 (29), ou de gènes codant pour les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I (16), et/ou (iii) l'induction d'angiogénèse (1, 2, 20). La protéine Tat doit donc être détoxifiée avant d'être utilisée comme antigène vaccinal. Une équipe a choisi de détoxifier la protéine Tat par inactivation chimique (10). Cependant, une telle inactivation ne peut être effectuée que dans l'optique de l'utilisation de protéines recombinantes comme antigènes vaccinaux. Afin de pouvoir utiliser la protéine Tat sous forme d'acide nucléique dans un vecteur recombinant, vivant ou non, seule une détoxification génétique pourra être envisagée. Les présents inventeurs ont donc choisi d'explorer cette voie pour la détoxification de la protéine Tat, par mutagenèse dirigée, pour permettre son utilisation à la fois comme sous-unité protéique vaccinale et/ou comme une partie d'un vecteur de vaccination.

La présente invention concerne l'utilisation d'un procédé de mutation de protéine, pour la préparation de mutants détoxifiés et immunogènes de la protéine Tat de type sauvage.

Par "mutants détoxifiés de la protéine Tat de type sauvage", on désigne une protéine Tat ne présentant plus les effets toxiques suivants :

- lorsqu'elle est sécrétée par une cellule infectée, la protéine Tat est toxique sous forme exogène sur les cellules non infectées par le VIH-1, par sa capacité à induire une signalisation cellulaire par fixation à des récepteurs de surface, et sa capacité à être internalisée par des cellules non infectées et transportée vers le noyau de la cellule

cible ;

- de façon exogène et endogène, la protéine Tat va se localiser dans le noyau de la cellule cible et induire la régulation de l'expression de gènes cellulaires, pouvant impliquer les propriétés transactivatrices ou le domaine 5 de la protéine Tat.

Par "mutants immunogènes de la protéine Tat de type sauvage", on désigne un mutant capable d'induire la production d'anticorps après injection à un animal modèle, ces anticorps ayant la capacité de réagir à la fois avec le mutant de la protéine Tat mais aussi avec la protéine Tat sauvage.

L'invention concerne également un procédé de préparation de mutants détoxifiés et immunogènes de la protéine Tat sauvage caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de préparation de mutants de la protéine Tat de type sauvage, notamment par mutation de l'acide nucléique codant pour la protéine Tat de type sauvage,

- une étape de criblage des mutants détoxifiés caractérisés par une absence d'activité transcellulaire et une altération de la localisation nucléaire, et éventuellement par une absence d'activité transactivatrice, et

- une étape de criblage des mutants immunogènes caractérisés par leur capacité à induire des anticorps dirigés à la fois contre lesdits mutants et la protéine Tat sauvage,

l'ordre des deux dernières étapes pouvant être inversé.

L'absence d'activité transcellulaire également désigne une absence de transport transcellulaire et peut être détectée dans une lignée cellulaire établie par l'absence d'activation du promoteur viral de la construction LTR-gène rapporteur, par exemple celui de la Chloramphenicol Acetyl-Transferase (CAT), dont l'expression est sous la

dépendance du promoteur viral (LTR) dans une lignée cellulaire établie (31), après mise en contact de ces cellules avec un mutant de la protéine Tat produit de façon exogène, par exemple par une autre lignée cellulaire que celle contenant le gène rapporteur sous la dépendance du LTR viral (32).

5 L'altération de la localisation nucléaire peut être définie comme la présence de la protéine Tat dans le compartiment cytoplasmique de cellules transfectées par des acides nucléiques codant pour les mutants de la protéine Tat sauvage, par exemple dans les 72 heures suivant la transfection, et peut être détectée soit par microscopie optique après transfection de lignées cellulaires par les acides nucléiques codant pour les mutants de la
10 protéine Tat par des techniques d'immunomarquage du produit de ces gènes, soit par la détection après transfection du produit de la traduction d'acides nucléiques contenant le gène codant pour un mutant de Tat fusionné au gène codant pour une protéine autofluorescente comme la protéine EGFP (33, 34).

15 L'absence d'activité transactivatrice correspond à l'absence d'activation du promoteur viral et peut être détectée par l'absence d'expression d'un gène rapporteur, par exemple celui de la Chloramphenicol Acetyl-Transferase (CAT), dont l'expression est sous la dépendance du promoteur viral (LTR) dans une lignée cellulaire établie, après transfection de cette lignée par des acides nucléiques codant pour les mutants de la protéine Tat sauvage (31).

20 L'invention concerne également un mutant détoxifié et immunogène de la protéine Tat du virus VIH-1 caractérisé en ce qu'il comporte au moins deux mutations dans les régions 4 et/ou 5 de la protéine Tat de type sauvage.

Un mutant avantageux selon la présente invention est un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une mutation dans la région 4.

25 L'invention concerne également un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que les mutations dans les domaines 4 et/ou 5 sont susceptibles de conférer l'une au moins des propriétés suivantes :

- l'abrogation de l'effet transcellulaire de la protéine Tat de type sauvage,
- l'altération de la localisation nucléaire de la protéine Tat de type sauvage.

30 L'invention concerne un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation additionnelle susceptible de conférer une perte de l'activité transactivatrice de la protéine Tat de type sauvage.

Une protéine Tat utilisable comme antigène de vaccination devra donc remplir le plus grand nombre des critères suivants :

- abrogation de l'effet transcellulaire de Tat (domaine 4 et/ou 5)
- altération de la localisation nucléaire de Tat (domaine 4)
- perte de l'activité transactivatrice (domaine 2)
- maintien de l'antigénicité de la protéine (4 ou 5 mutations maximum, modifiant le moins possible les épitopes CTL)

Selon un mode de réalisation avantageux, la présente invention concerne un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation dans la

région N-terminale du domaine 4 de la protéine Tat de type sauvage, notamment dans la partie délimitée de l'acide aminé en position 49 à l'acide aminé en position 57.

Un mutant avantageux selon l'invention est un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation dans la région N-terminale du domaine 4 de la protéine Tat de type sauvage dans la partie délimitée de l'acide aminé en position 49 à l'acide aminé en position 55.

Un mutant avantageux selon l'invention est un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation dans l'une au moins des régions suivantes dans le domaine 5 de la protéine Tat de type sauvage :

- le motif RGD,
- la région 88-92, de préférence en positions 89 et/ou 92.

Un mutant avantageux selon l'invention est un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation dans le domaine 2 de la protéine Tat de type sauvage, notamment le remplacement de l'une quelconque des cystéines, avantageusement par une sérine.

L'invention concerne également un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comporte l'une au moins des mutations suivantes :

- remplacement en position 27 d'une cystéine par une sérine,
- remplacement en position 51 d'une lysine par une thréonine,
- remplacement en position 52 d'une arginine par une leucine,
- remplacement en position 55 d'une arginine par une leucine,
- remplacement en position 57 d'une arginine par une leucine,
- remplacement en position 79 d'une glycine par une alanine,

- remplacement en position 89 d'une lysine par une leucine,
- remplacement en position 92 d'un acide glutamique par une glutamine.

L'invention concerne également un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant deux mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

K51T-R52L

K51T-R55L

K51T-R57L

K51T-G79A

K51T-K89L

K51T-E92Q

R52L-R55L

R52L-R57L

R52L-G79A

R52L-K89L

R52L-E92Q

R55L-R57L

R55L-G79A

R55L-K89L

R55L-E92Q

R57L-G79A

R57L-K89L

R57L-E92Q

G79A-K89L

G79A-E92Q

K89L-E92Q

Un mutant avantageux selon la présente invention est un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

K51T-R55L

- remplacement en position 89 d'une lysine par une leucine,
- remplacement en position 92 d'un acide glutamique par une glutamine.

L'invention concerne également un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant deux mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

	K51T-R52L	(SEQ ID NO : 2)
10	K51T-R55L	(SEQ ID NO : 3)
	K51T-R57L	(SEQ ID NO : 4)
	K51T-G79A	(SEQ ID NO : 5)
	K51T-K89L	(SEQ ID NO : 6)
	K51T-E92Q	(SEQ ID NO : 7)
15	R52L-R55L	(SEQ ID NO : 8)
	R52L-R57L	(SEQ ID NO : 9)
	R52L-G79A	(SEQ ID NO : 10)
	R52L-K89L	(SEQ ID NO : 11)
	R52L-E92Q	(SEQ ID NO : 12)
20	R55L-R57L	(SEQ ID NO : 13)
	R55L-G79A	(SEQ ID NO : 14)
	R55L-K89L	(SEQ ID NO : 15)
	R55L-E92Q	(SEQ ID NO : 16)
	R57L-G79A	(SEQ ID NO : 17)
25	R57L-K89L	(SEQ ID NO : 18)
	R57L-E92Q	(SEQ ID NO : 19)
	G79A-K89L	(SEQ ID NO : 20)
	G79A-E92Q	(SEQ ID NO : 21)
	K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 22)

Un mutant avantageux selon la présente invention est un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

K51T-R55L (SEQ ID NO : 3)

R52L-R55L

R52L-G79A

R55L-R57L

G79A-K89L

5 L'invention concerne également un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant trois mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

C27S-K51T-R52L

C27S-K51T-R55L

C27S-K51T-R57L

C27S-K51T-G79A

15 C27S-K51T-K89L

C27S-K51T-E92Q

C27S-R52L-R55L

C27S-R52L-R57L

C27S-R52L-G79A

20 C27S-R52L-K89L

C27S-R52L-E92Q

C27S-R55L-R57L

C27S-R55L-G79A

C27S-R55L-K89L

25 C27S-R55L-E92Q

C27S-R57L-G79A

C27S-R57L-K89L

C27S-R57L-E92Q

C27S-G79A-K89L

30 C27S-G79A-E92Q

C27S-K89L-E92Q

R52L-R55L (SEQ ID NO : 8)
 R52L-G79A (SEQ ID NO : 10)
 R55L-R57L (SEQ ID NO : 13)
 G79A-K89L (SEQ ID NO : 20)

5 L'invention concerne également un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant trois mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre

10 correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

	C27S-K51T-R52L	(SEQ ID NO : 23)
	C27S-K51T-R55L	(SEQ ID NO : 24)
	C27S-K51T-R57L	(SEQ ID NO : 25)
	C27S-K51T-G79A	(SEQ ID NO : 26)
15	C27S-K51T-K89L	(SEQ ID NO : 27)
	C27S-K51T-E92Q	(SEQ ID NO : 28)
	C27S-R52L-R55L	(SEQ ID NO : 29)
	C27S-R52L-R57L	(SEQ ID NO : 30)
	C27S-R52L-G79A	(SEQ ID NO : 31)
20	C27S-R52L-K89L	(SEQ ID NO : 32)
	C27S-R52L-E92Q	(SEQ ID NO : 33)
	C27S-R55L-R57L	(SEQ ID NO : 34)
	C27S-R55L-G79A	(SEQ ID NO : 35)
	C27S-R55L-K89L	(SEQ ID NO : 36)
25	C27S-R55L-E92Q	(SEQ ID NO : 37)
	C27S-R57L-G79A	(SEQ ID NO : 38)
	C27S-R57L-K89L	(SEQ ID NO : 39)
	C27S-R57L-E92Q	(SEQ ID NO : 40)
	C27S-G79A-K89L	(SEQ ID NO : 41)
30	C27S-G79A-E92Q	(SEQ ID NO : 42)
	C27S-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 43)

La présente invention concerne également un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

C27S-K51T-R55L

C27S-R52L-R55L

5 C27S-R52L-G79A

La présente invention concerne un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant quatre mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

C27S-K51T-R52L-G79A

C27S-K51T-R52L-K89L

C27S-K51T-R52L-E92Q

15 C27S-K51T-R55L-G79A

C27S-K51T-R55L-K89L

C27S-K51T-R55L-E92Q

C27S-K51T-R57L-G79A

C27S-K51T-R57L-K89L

20 C27S-K51T-R57L-E92Q

C27S-K51T-G79A-K89L

C27S-K51T-G79A-E92Q

C27S-K51T-K89L-E92Q

C27S-R52L-G79A-K89L

25 C27S-R52L-G79A-E92Q

C27S-R52L-K89L-E92Q

C27S-R52L-R55L-G79A

C27S-R52L-R55L-K89L

C27S-R52L-R55L-E92Q

30 C27S-R52L-R57L-G79A

C27S-R52L-R57L-K89L

C27S-R52L-R57L-E92Q

La présente invention concerne également un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

C27S-K51T-R55L (SEQ ID NO : 24)

C27S-R52L-R55L (SEQ ID NO : 29)

5 C27S-R52L-G79A (SEQ ID NO : 31)

La présente invention concerne un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant quatre mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre

10 correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

C27S-K51T-R52L-G79A (SEQ ID NO : 44)

C27S-K51T-R52L-K89L (SEQ ID NO : 45)

C27S-K51T-R52L-E92Q (SEQ ID NO : 46)

15 C27S-K51T-R55L-G79A (SEQ ID NO : 47)

C27S-K51T-R55L-K89L (SEQ ID NO : 48)

C27S-K51T-R55L-E92Q (SEQ ID NO : 49)

C27S-K51T-R57L-G79A (SEQ ID NO : 50)

C27S-K51T-R57L-K89L (SEQ ID NO : 51)

20 C27S-K51T-R57L-E92Q (SEQ ID NO : 52)

C27S-K51T-G79A-K89L (SEQ ID NO : 53)

C27S-K51T-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 54)

C27S-K51T-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 55)

C27S-R52L-G79A-K89L (SEQ ID NO : 56)

25 C27S-R52L-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 57)

C27S-R52L-K89L-E92Q (SEQ ID NO : 58)

C27S-R52L-R55L-G79A (SEQ ID NO : 59)

C27S-R52L-R55L-K89L (SEQ ID NO : 60)

C27S-R52L-R55L-E92Q (SEQ ID NO : 61)

30 C27S-R52L-R57L-G79A (SEQ ID NO : 62)

C27S-R52L-R57L-K89L (SEQ ID NO : 63)

C27S-R52L-R57L-E92Q (SEQ ID NO : 64)

C27S-R55L-G79A-K89L
C27S-R55L-G79A-E92Q
C27S-R55L-K89L-E92Q
C27S-R55L-R57L-G79A
5 C27S-R55L-R57L-K89L
C27S-R55L-R57L-E92Q
C27S-R57L-G79A-K89L
C27S-R57L-G79A-E92Q
C27S-R57L-K89L-E92Q
10 C27S-G79A-K89L-E92Q

Un mutant avantageux selon la présente invention est caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

C27S-K51T-R55L-G79A
C27S-K51T-R55L-K89L
15 C27S-K51T-R55L-E92Q
C27S-R52L-R55L-G79A

La présente invention concerne un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant cinq mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le
20 chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

C27S-K51T-G79A-K89L-E92Q
C27S-K51T-R52L-R55L-G79A
25 C27S-K51T-R52L-R55L-K89L
C27S-K51T-R52L-R55L-E92Q
C27S-K51T-R52L-R57L-G79A
C27S-K51T-R52L-R57L-K89L
C27S-K51T-R52L-R57L-E92Q
30 C27S-K51T-R52L-G79A-K89L
C27S-K51T-R52L-G79A-E92Q
C27S-K51T-R52L-K89L-E92Q

	C27S-R55L-G79A-K89L	(SEQ ID NO : 65)
	C27S-R55L-G79A-E92Q	(SEQ ID NO : 66)
	C27S-R55L-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 67)
	C27S-R55L-R57L-G79A	(SEQ ID NO : 68)
5	C27S-R55L-R57L-K89L	(SEQ ID NO : 69)
	C27S-R55L-R57L-E92Q	(SEQ ID NO : 70)
	C27S-R57L-G79A-K89L	(SEQ ID NO : 71)
	C27S-R57L-G79A-E92Q	(SEQ ID NO : 72)
	C27S-R57L-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 73)
10	C27S-G79A-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 74)

Un mutant avantageux selon la présente invention est caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

	C27S-K51T-R55L-G79A	(SEQ ID NO : 47)
	C27S-K51T-R55L-K89L	(SEQ ID NO : 48)
15	C27S-K51T-R55L-E92Q	(SEQ ID NO : 49)
	C27S-R52L-R55L-G79A	(SEQ ID NO : 59)

La présente invention concerne un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant cinq mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le

20 chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

	C27S-K51T-G79A-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 75)
	C27S-K51T-R52L-R55L-G79A	(SEQ ID NO : 76)
25	C27S-K51T-R52L-R55L-K89L	(SEQ ID NO : 77)
	C27S-K51T-R52L-R55L-E92Q	(SEQ ID NO : 78)
	C27S-K51T-R52L-R57L-G79A	(SEQ ID NO : 79)
	C27S-K51T-R52L-R57L-K89L	(SEQ ID NO : 80)
	C27S-K51T-R52L-R57L-E92Q	(SEQ ID NO : 81)
30	C27S-K51T-R52L-G79A-K89L	(SEQ ID NO : 82)
	C27S-K51T-R52L-G79A-E92Q	(SEQ ID NO : 83)
	C27S-K51T-R52L-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 84)

C27S-K51T-R55L-R57L-G79A
 C27S-K51T-R55L-R57L-K89L
 C27S-K51T-R55L-R57L-E92Q
 C27S-K51T-R55L-G79A-K89L
 C27S-K51T-R55L-G79A-E92Q
 C27S-K51T-R55L-K89L-E92Q
 C27S-K51T-R57L-G79A-K89L
 C27S-K51T-R57L-G79A-E92Q
 C27S-K51T-R57L-K89L-E92Q
 C27S-R52L-R55L-R57L-G79A
 C27S-R52L-R55L-R57L-K89L
 C27S-R52L-R55L-R57L-E92Q
 C27S-R52L-R55L-G79A-K89L
 C27S-R52L-R55L-G79A-E92Q
 C27S-R52L-R55L-K89L-E92Q
 C27S-R52L-R57L-G79A-K89L
 C27S-R52L-R57L-G79A-E92Q
 C27S-R52L-R57L-K89L-E92Q
 C27S-R52L-G79A-K89L-E92Q
 C27S-R55L-R57L-G79A-K89L
 C27S-R55L-R57L-G79A-E92Q
 C27S-R55L-R57L-K89L-E92Q
 C27S-R55L-G79A-K89L-E92Q
 C27S-R57L-G79A-K89L-E92Q

Un mutant avantageux selon l'invention est un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

C27S-K51T-R55L-G79A-K89L
 C27S-K51T-R55L-G79A-E92Q

La présente invention concerne également des séquences nucléotidiques codant pour l'un des mutants tels que définis ci-dessus.

La présente invention concerne également les lignées cellulaires transfectées avec une séquence nucléotidique de l'invention.

	C27S-K51T-R55L-R57L-G79A	(SEQ ID NO : 85)
	C27S-K51T-R55L-R57L-K89L	(SEQ ID NO : 86)
	C27S-K51T-R55L-R57L-E92Q	(SEQ ID NO : 87)
	C27S-K51T-R55L-G79A-K89L	(SEQ ID NO : 88)
5	C27S-K51T-R55L-G79A-E92Q	(SEQ ID NO : 89)
	C27S-K51T-R55L-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 90)
	C27S-K51T-R57L-G79A-K89L	(SEQ ID NO : 91)
	C27S-K51T-R57L-G79A-E92Q	(SEQ ID NO : 92)
	C27S-K51T-R57L-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 93)
10	C27S-R52L-R55L-R57L-G79A	(SEQ ID NO : 94)
	C27S-R52L-R55L-R57L-K89L	(SEQ ID NO : 95)
	C27S-R52L-R55L-R57L-E92Q	(SEQ ID NO : 96)
	C27S-R52L-R55L-G79A-K89L	(SEQ ID NO : 97)
	C27S-R52L-R55L-G79A-E92Q	(SEQ ID NO : 98)
15	C27S-R52L-R55L-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 99)
	C27S-R52L-R57L-G79A-K89L	(SEQ ID NO : 100)
	C27S-R52L-R57L-G79A-E92Q	(SEQ ID NO : 101)
	C27S-R52L-R57L-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 102)
	C27S-R52L-G79A-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 103)
20	C27S-R55L-R57L-G79A-K89L	(SEQ ID NO : 104)
	C27S-R55L-R57L-G79A-E92Q	(SEQ ID NO : 105)
	C27S-R55L-R57L-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 106)
	C27S-R55L-G79A-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 107)
	C27S-R57L-G79A-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 108)

25 Un mutant avantageux selon l'invention est un mutant tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

C27S-K51T-R55L-G79A-K89L (SEQ ID NO : 88)

C27S-K51T-R55L-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 89)

30 La présente invention concerne également des séquences nucléotidiques codant pour l'un des mutants tels que définis ci-dessus.

La présente invention concerne également les lignées cellulaires transfectées avec une séquence nucléotidique de l'invention.

L'invention concerne également des anticorps dirigés contre l'un des mutants tels que définis ci-dessus.

Les anticorps selon l'invention sont des anticorps polyclonaux ou monoclonaux.

Les anticorps polyclonaux susmentionnés sont obtenus par immunisation d'un animal avec au moins un mutant selon l'invention, suivie de la récupération des anticorps recherchés sous forme purifiée, par prélèvement du sérum dudit animal, et séparation desdits anticorps des autres constituants du sérum, notamment par chromatographie d'affinité sur une colonne sur laquelle est fixée un antigène spécifiquement reconnu par les anticorps, notamment un mutant selon l'invention.

Les anticorps monoclonaux selon l'invention peuvent être obtenus par la technique des hybridomes dont le principe général est rappelé ci-après.

Dans un premier temps, on immunise un animal, généralement une souris, (ou des cellules en culture dans le cadre d'immunisations *in vitro*) avec un mutant selon l'invention, dont les lymphocytes B sont alors capables de produire des anticorps contre ledit mutant. Ces lymphocytes producteurs d'anticorps sont ensuite fusionnés avec des cellules myélomateuses "immortelles" (murines dans l'exemple) pour donner lieu à des hybridomes. A partir du mélange hétérogène des cellules ainsi obtenu, on effectue alors une sélection des cellules capables de produire un anticorps particulier et de se multiplier indéfiniment. Chaque hybridome est multiplié sous la forme de clone, chacun conduisant à la production d'un anticorps monoclonal dont les propriétés de reconnaissance vis-à-vis du mutant de l'invention pourront être testées par exemple en ELISA, par immunotransfert en une ou deux dimensions, en immunofluorescence, ou à l'aide d'un biocapteur. Les anticorps monoclonaux ainsi sélectionnés, sont par la suite purifiés notamment selon la technique de chromatographie d'affinité décrite ci-dessus.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique, notamment vaccin, contenant à titre de substance active l'un au moins des mutants tels que définis ci-dessus ou l'une au moins des séquences nucléotidiques telles que définies ci-dessus, placé sous le contrôle d'éléments nécessaires à une expression constitutive de l'un des mutants tels que définis ci-dessus ou l'un au moins des anticorps tels que définis ci-dessus, en association avec un véhicule pharmaceutiquement approprié.

Bien entendu, l'homme du métier déterminera facilement la quantité de mutant à utiliser en fonction des constituants de la composition pharmaceutique.

La présente invention concerne également une composition diagnostique pour la détection et/ou la quantification du virus VIH-1 comprenant au moins un mutant tel que défini ci-dessus, ou au moins un anticorps tel que défini ci-dessus.

Bien entendu, l'homme du métier déterminera facilement la quantité de mutant à utiliser en fonction de la technique diagnostique utilisée.

L'invention concerne également un procédé de détection et/ou de quantification du virus VIH-1 dans un échantillon biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté par le VIH-1, tel que plasma, sérum ou tissu, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

— mettre en contact ledit échantillon biologique avec une composition diagnostique comprenant un mutant tel que défini ci-dessus ou un anticorps tel que défini ci-dessus, dans des conditions prédéterminées qui permettent, s'il y a lieu, la formation de complexes anticorps/antigène(s) entre le mutant susdéfini et des anticorps dirigés contre la protéine Tat de type sauvage ou entre les anticorps susdéfinis et la protéine Tat de type sauvage, et

— détecter et/ou quantifier la formation desdits complexes par tout moyen approprié.

Les procédés de détection et/ou de quantification du virus sont mis en œuvre à l'aide de techniques classiques bien connues de l'homme du métier et on peut citer, à titre d'illustration, les blots, les techniques dites sandwich et les techniques de compétitions.

L'invention concerne également l'utilisation d'au moins un mutant tel que défini ci-dessus ou d'au moins un anticorps tel que défini ci-dessus pour le diagnostic *in vitro* du virus VIH-1 dans un échantillon ou prélèvement biologique.

L'invention concerne également l'utilisation d'au moins un mutant tel que défini ci-dessus ou d'au moins un anticorps tel que défini ci-dessus pour la préparation d'une composition vaccinale.

Les Inventeurs ont ainsi montré que pour les utilisations précitées, il était nécessaire d'effectuer au moins une mutation au niveau du domaine 4 et/ou au moins une mutation au niveau du domaine 5 de la protéine Tat. Ils ont obtenus par mutagenèse dirigée des mutants de la protéine Tat qui ont ensuite été sélectionnés en fonction de leurs propriétés. Les mutants retenus sont choisis parmi les mutants présentant au moins

une des mutations suivantes : K51T (remplacement en position 51 d'une lysine par une thréonine au niveau du domaine 4), R52L (remplacement d'une arginine par une leucine en position 52 dans le domaine 4), R55L (remplacement d'une arginine par une leucine en position 55 dans le domaine 4), R57L (remplacement d'une arginine par une leucine en position 57 dans le domaine 4), G79A (remplacement d'une glycine par une alanine en position 79 dans le domaine 5), K89L (remplacement d'une lysine par une leucine en position 89 dans le domaine 5) et E92Q (remplacement d'un acide glutamique par une glutamine en position 92 dans le domaine 5). Tous les positionnements en acides aminés décrits ci dessus et par la suite sont donnés en référence à la séquence complète de 101 acides aminés de la souche ACH320.2A.2.1. L'invention a pour objet les mutants précités. Mais l'invention concerne également des mutants présentant deux mutations au niveau du domaine 4 de la protéine Tat. Ces mutants "doubles" sont sélectionnés parmi les mutants K51T-R55L, R52L-R55L, R52L-G79A, R55L-R57L et G79A-K89L. Les inventeurs ont ensuite montré qu'en associant ces doubles mutations dans le domaine 4 à une mutation supplémentaire C27S dans le domaine 2 (remplacement d'une cystéine par une sérine), ils obtenaient des résultats très satisfaisants. Ainsi, l'invention englobe également un mutant choisi parmi les "triple" mutants C27S-K51T-R55L, C27S-R52L-R55L et C27S-R52L-G79A. De préférence, le mutant choisi est le mutant C27S-K51T-R55L. Enfin, ils ont prouvé qu'un "quadruple" mutant associant au moins une mutation dans le domaine 2, deux mutations dans le domaine 4 et au moins une mutation dans le domaine 5 présentait d'excellentes performances pour l'obtention d'une protéine Tat non toxique. Le "quadruple" mutant est choisi parmi les mutants C27S-K51T-R55L-G79A, C27S-K51T-R55L-K89L, C27S-K51T-R55L-E92Q et C27S-R52L-R55L-G79A. De préférence, le mutant choisi est le mutant C27S-K51T-R55L-G79A.

DESCRIPTION DES FIGURES

La Figure 1 représente une représentation schématique de la technique de mutagenèse ponctuelle dirigée par PCR.

5

La Figure 2 représente l'alignement de la séquence protéique de la protéine Tat de la souche ACH320.2A.2.1 et des séquences protéiques des protéines Tat mutées de l'invention.

10

La Figure 3 correspond à un diagramme représentant la capacité transactivatrice de ACH320.2A.2.1 ou de ses mutants. Les résultats représentés pour chaque construction correspondent à la moyenne de deux expériences indépendantes. La colonne NT (non transfecté) représente l'activité basale de la construction LTR-CAT.

L'axe des ordonnées représente le facteur multiplicatif de transactivation.

15

La Figure 4 représente la localisation intracellulaire de la construction ACH320.2A.2.1 ou de ses mutants.

20

La Figure 5 représente la capacité de transduction de la construction ACH320.2A.2.1 ou de ses mutants. Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne de deux expériences indépendantes. La ligne de coupure a été déterminée en calculant la moyenne + 3 SD (déviations standard) du pourcentage de transactivation mesuré pour pEGFP.

25

Les colonnes blanches correspondent à une co-culture 293T/HL3T1 et les colonnes noires à la transfection des cellules HL3T1.

L'axe des ordonnées correspond au pourcentage de transactivation par rapport à ACH320.2A.2.1 sauvage.

30

Le Tableau 1 représente les oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée par PCR de Tat.

DESCRIPTION DES FIGURES

La Figure 1 représente une représentation schématique de la technique de mutagenèse ponctuelle dirigée par PCR.

La Figure 2 représente l'alignement de la séquence protéique de la protéine Tat de la souche ACH320.2A.2.1 (SEQ ID NO : 1) et des séquences protéiques des protéines Tat mutées de l'invention.

La Figure 3 correspond à un diagramme représentant la capacité transactivatrice de ACH320.2A.2.1 ou de ses mutants. Les résultats représentés pour chaque construction correspondent à la moyenne de deux expériences indépendantes. La colonne NT (non transfecté) représente l'activité basale de la construction LTR-CAT.

L'axe des ordonnées représente le facteur multiplicatif de transactivation.

La Figure 4 représente la localisation intracellulaire de la construction ACH320.2A.2.1 ou de ses mutants.

La Figure 5 représente la capacité de transduction de la construction ACH320.2A.2.1 ou de ses mutants. Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne de deux expériences indépendantes. La ligne de coupure a été déterminée en calculant la moyenne + 3 SD (déviati^on standard) du pourcentage de transactivation mesuré pour pEGFP.

Les colonnes blanches correspondent à une co-culture 293T/HL3T1 et les colonnes noires à la transfection des cellules HL3T1.

L'axe des ordonnées correspond au pourcentage de transactivation par rapport à ACH320.2A.2.1 sauvage.

Le Tableau 1 représente les oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée par PCR de Tat.

EXEMPLE 1 : Construction de l'ADN muté codant pour la protéine Tat mutée.

Un fragment de l'ADNc de 306 paires de bases correspondant au deux exons du gène Tat du type sauvage de l'isolat ACH320.2A.2.1 de VIH-1 (11,12) est muté en utilisant un kit PCR commercial (Clontech) et les amorces nucléotidiques décrites dans le tableau 1. Le principe de la mutagenèse dirigée ponctuelle par PCR est décrit à la figure 1.

Comme montré sur la figure 1, à partir de l'ADNc du gène *tat* sauvage, on effectue deux PCR de façon indépendante avec une amorce située à l'extrémité (E5' ou E3') et une amorce interne située dans le gène et portant la mutation souhaitée (M3' et M5', respectivement) (premier cycle de la PCR). On mélange alors les deux produits de PCR de façon équimolaire et on effectue un deuxième cycle de PCR avec des amorces d'extrémité contenant les sites de restriction EcoRI en 5' et SalI en 3'. On obtient ainsi les ADNc mutés à l'endroit désiré.

Ce principe a été utilisé pour tous les mutants sauf pour les mutations K89L et E92Q. Pour ces dernières les nucléotides devant être mutés étaient localisés à proximité d'une des extrémités de l'ADNc, permettant une mutagenèse dirigée par PCR semi nichée directe en utilisant pour le premier cycle de PCR respectivement les paires d'amorces suivantes : E5'/K89L (M3') et E5'/E92Q (M5').

Le double mutant R52L-R55L, a été généré en utilisant les amorces pour mutagenèse simple suivantes contenant les deux mutations :

R52L-R55L (M5')

5'-GGCAGGAAGCTTAGACAGCTGCGAAGATC-3',

R52L-R55L (M3')

5'-GATCTTCGCAGCTGTCTAAGCTTCTCCTGCC-3'

Le double mutant R52L-G79A a été obtenu en utilisant comme matrice l'ADNc du mutant G79A et comme paire d'amorces la paire R52L (M5') / R52L (M3') pour la mutagenèse dirigée par PCR.

Le double mutant G79A-K89L a été généré par PCR semi nichée en utilisant comme matrice l'ADNc du mutant G79A et la paire d'amorces E5' / K89L (M3') pour le premier cycle de PCR.

Le triple mutant C27S-K51T-R55L (STL) a été obtenu en utilisant l'ADNc du

double mutant K51T-R55L comme matrice et une paire d'amorces C27S (M5') / C27S (M3') pour la mutagenèse dirigée par PCR.

Le triple mutant C27S-R52L-G79A a été obtenu en utilisant comme matrice l'ADNc du mutant R52L-G79A et comme paire d'amorces la paire C27S (M5') / C27S (M3') pour la mutagenèse dirigée par PCR.

Le quadruple mutant C27S-K51T-R55L-G79A (STLA) a été généré en utilisant l'ADNc de STL comme matrice et les amorces G79A (M5') / G79A (M3') pour la mutagenèse.

Tous les premiers cycles de PCR ont été réalisés en utilisant 0,5µg de plasmide, 0,2ng/ml de chacune des amorces dans les conditions suivantes : 1x94°C 5' 1x[94°C 2' 50°C 2' 72°C 4'] 25x[94°C 1' 50°C 1' 72°C 4'] 1x72°C 5'.

La paire d'amorce EcoRI / SalI a été utilisée pour le second cycle de toutes les mutagenèses dirigées par PCR, excepté pour les mutants R52L, R55L et le double mutant R52L-R55L, pour lesquels l'amorce SalI 3' a été remplacée par l'amorce E6854. Dans tous les cas le second cycle a été réalisé en utilisant les mêmes conditions que pour le premier cycle et 0,5µl des produits de PCR 5' et 3' des premiers cycles (figure 1). Une bande de 323 paires de bases a été créée et a ensuite été liée dans le plasmide pCR2.1-Topo (Invitrogen, K4500-40) selon le protocole du fabricant pour créer les constructions pCR-TEX.

Les clones positifs ont été ensuite sélectionnés après séquençage automatisé en utilisant le DyeTerminator sequencing mix (nom commercial) sur le séquenceur automatique 377X (Applied Biosystems). L'analyse des séquences a été faite en utilisant le logiciel MacVector 7.0 (Oxford Molecular). Parmi toutes les constructions séquencées, toutes contenaient uniquement la mutation désirée, sauf l'un des clones dérivé du produit PCR-R55L, qui montrait une mutation supplémentaire K->T à la position 51. Ce double mutant K51T-R55L a été donc conservé pour une analyse supplémentaire, et le mutant simple K51T a été généré en utilisant les amorces K51T (M5') et K51T (M3').

Les fragments EcoRI-SalI ou EcoRI-EcoRI des constructions pCR-TEX ont été sous clonés dans un vecteur eucaryote pEGFP-C2 (Clontech) dans lequel le mutant Tat est fusionné en position C-terminale avec EGFP (Enhanced Fluorescent Green Protein). Il a été montré auparavant que la fusion de l'EGFP à Tat n'altère pas la capacité

transactivatrice de Tat, ni sa localisation cellulaire (25). Les étapes de clonage ont été réalisées dans *Escherichia coli* (*E. Coli*) DH5 α selon les techniques standards de biologie moléculaire (23). Les constructions pEGFP-TEX, dans lesquelles l'expression de la protéine de fusion est sous le contrôle du promoteur du Cytomegalovirus (CMV) ont été obtenues et criblées par séquençage automatique pour les clones positifs. Les séquences en acides aminés des clones positifs qui ont été sélectionnés sont représentées à la figure 2. L'ADN de ces clones a été amplifié, purifié en utilisant le kit Nucléobond AX (nom commercial) (Macherey-Nagel), selon les instructions du fabricant.

EXEMPLE 2 : Capacité de trans-activation des mutants Tat.

Pour étudier la capacité trans-activatrice des protéines de fusion EGFP-Tat, la lignée cellulaire HL3T1 a été utilisée. Cette lignée est un dérivé de cellules HeLa, transfecté de manière stable avec un gène de la Chloramphenicol Acetyl Transferase (CAT) sous la dépendance du promoteur viral de VIH-1 (LTR) (8). Un jour après ensemencement de $2,5 \times 10^5$ cellules HL3T1 dans des plaques de 6 puits, les cellules ont été transfectées avec 2 μ g des constructions pEGFP-TEX en utilisant le kit Exgen 500 (commercialisé par Euromedex) selon le protocole préconisé par le fabricant. Après 48 heures à 72 heures de culture, les cellules ont été trypsinisées et la quantité de cellules transfectées a été estimée par microscopie de fluorescence. L'équivalent de $1,5 \times 10^3$ cellules fluorescentes a été lysé dans 100 μ l de Tris 0,01M-EDTA 1nM-NaCl 150mM (TEN) et soumis à une étape de congélation/décongélation avant traitement pendant 20 minutes à 65°C. La mesure de l'activité CAT a été ensuite réalisée dans un essai d'extraction de phases, comme précédemment décrit (24). Brièvement, 70 μ l de lysats cellulaires ont été incubés pendant 2 heures à 37°C avec 130 μ l du mélange réactionnel CAT (Tris-HCl pH=7,5 150mM, EDTA 0,2nM, NaCl 30mM, Butyryl Coenzyme A 0,3mg/ml, glycerol 3%, D-threo-[dichloroacetyl-1- 14 C]chloramphenicol 0,08 μ Ci). Le mélange réactionnel a ensuite été extrait en utilisant 400 μ l d'un mélange de pristane (2,6,10,14-tetramethylpentadecane) et de xylène à un rapport volume/volume de 2 : 1. La radioactivité a été mesurée sur 300 μ l de la phase organique résultante en utilisant un compteur à scintillation.

La figure 3 montre qu'aucune des mutations simples ne permet à elle seule de détruire complètement l'activité trans-activatrice de la protéine Tat de ACH320.2A.2.1,

sauf pour le mutant C27S. Le mutant R55L ne modifie pas de manière très significative l'activité trans-activatrice de Tat de ACH320.2A.2.1. Mais cette mutation combinée avec l'une des mutations K51T ou R52L montre une inhibition très significative de l'activité trans-activatrice de Tat. Cette inhibition est totale pour les triple et quadruple mutants STL et STLA.

EXEMPLE 3 : Localisation intracellulaire des protéines de fusion Tat-EGFP.

Le domaine basique de Tat est responsable de la localisation nucléaire de Tat. Certaines des mutations qui ont été construites affectent ce domaine basique. Aussi, les inventeurs ont voulu identifier les mutations qui affectaient la localisation intracellulaire de Tat. Après ensemencement de $2,5 \times 10^5$ cellules HL3T1 sur des lamelles de microscopie, les cellules ont été transfectées avec 2µg de chaque construction pEGFP-TEX en utilisant le kit Exgen 500 (commercialisé par Euromedex) selon le protocole préconisé par le fabricant. Après 1, 2 ou 3 jours les lamelles sont récupérées et fixées avec du paraformaldéhyde 4% avant observation sur microscope à fluorescence Axioplan 2 (nom commercial) (Zeiss). Comme montré à la figure 4 A et B et comme cela a déjà été décrit (25), la protéine de fusion Tat-EGFP de type sauvage montrait une localisation nucléaire au bout de 3 jours de culture. Les simples mutations de Tat n'affectaient pas cette localisation (figure 4 C à H), de même que la double mutation R52L-R55L (figure 4I). Cependant, la combinaison K51T-R55L ou des mutants multiples la contenant (STL, STLA) montraient à la fois une localisation nucléaire et cytoplasmique de la protéine Tat-EGFP au 3^{ème} jour (figure 4J à L), alors que le signal était strictement nucléaire au 1^{er} et 2^{ème} jour suivant la transfection. Il semble donc que le signal de la localisation nucléaire de Tat est discontinu et contient au moins les résidus K51 et R55, mais pas R52.

EXEMPLE 4 : Activité transcellulaire des mutants Tat.

Différentes études ont montré que le nombre total de résidus basiques dans le domaine basique de Tat joue un rôle dans la capacité de la protéine Tat, sécrétée par des cellules infectées et présente dans le milieu extracellulaire, à être internalisée par des cellules non infectées, phénomène également appelé transduction. Les inventeurs ont évalué la capacité de transduction des constructions contenant des mutations dans ce

domaine basique. Un essai de co-culture a été effectué entre des cellules productrices et des cellules effectrices. Les cellules 293T ont été transfectées avec 3µg des constructions pEGFP-TEX en utilisant la technique au phosphate de calcium (23). 24 heures après la transfection, les cellules 293T transfectées ont été trypsinées et co-cultivées avec $2,5 \times 10^5$ cellules HL3T1 pendant 48 heures supplémentaires en présence de 100µM chloroquinine. Les cellules ont ensuite été récoltées et lysées dans du TEN avant évaluation de l'activité CAT, comme décrit précédemment. Parce que ce système dépend à la fois de l'efficacité de la transduction et de l'activité trans-activatrice, les inventeurs sont partis du postulat qu'un changement drastique dans la capacité de

transduction se traduirait par une différence significative entre l'activité mesurée après transfection directe et l'activité mesurée après co-culture, par rapport à un contrôle positif standardisé. C'est la raison pour laquelle toutes les données sont représentées en pourcentage de l'activité trans-activatrice de la protéine de type sauvage de l'isolat ACH320.2A.2.1 et que les données obtenues à partir de la transfection des cellules HL3T1 et la co-culture des cellules 293T/HL3T1 sont comparées pour chaque construction. Comme montré à la figure 5, la mutation R55L n'altère pas de manière significative la capacité de transduction de la protéine. La mutation R52L diminue de manière significative la capacité de transduction de la protéine (diminution de 5 fois de l'activité CAT entre les cellules HL3T1 transfectées avec cette construction et les cellules HL3T1 co-cultivées avec les cellules 293T exprimant pEGFP-TEX-R52L). Le double mutant R52L-R55L montre une perte complète de sa capacité de transduction, comme montré par le bruit de fond de l'activité CAT mesurée après co-culture. Les résultats obtenus à la fois avec les mutants R52L et R52L-R55L plaident en faveur du fait que la capacité de transduction de Tat est corrélée avec le nombre de résidus arginine dans le domaine basique (27). Il semblerait que le résidu R55 est moins important pour la capacité de transduction de Tat que le résidu R52. Donc, la localisation des résidus arginine pourrait aussi jouer un rôle dans le mécanisme complet de la transduction.

EXEMPLE 5 : Clonage de lignées cellulaires transfectées avec les séquences nucléotidiques de l'invention.

De nombreux tests fonctionnels de la régulation de gènes cellulaires par la protéine Tat du VIH-1 impliquent l'utilisation de lignées cellulaires exprimant de façon constitutive cette protéine. Les Inventeurs ont donc établi des lignées cellulaires exprimant les différents mutants de la protéine Tat. Pour ce faire, des cellules HeLa ont étéensemencées à $2,5 \times 10^5$ cellules par puits d'une plaque 6 puits puis transfectées le lendemain avec 2 μ g d'ADN codant pour les divers mutants de Tat en utilisant le réactif Exgen 500 (commercialisé par Euromedex). Afin d'effectuer un clonage biologique de ces lignées transfectées, les cellules ont été trypsinées et comptées 3 jours après transfection, puisensemencées à une concentration de 3 à 30 cellules par puits dans des plaques 96 puits à fond plat, à raison de 3 à 5 plaques 96 puits par transfection (pour un total de 288 à 480 puits par transfection). La culture en plaque 96 puits a alors été effectuée pendant 15 jours en présence de 500 μ g/ml de généticine (Généticine Sulfate, Gibco-BRL). Après 15 jours, les puits dans lesquels les cellules étaient encore vivantes et s'étaient multipliées de façon notable étaient considérés comme positifs. De façon standard, un clonage biologique a été considéré comme réussi lorsque chaque plaque 96 puits issue de la même transfection contenait moins de 10 puits positifs par plaque. De 3 à 15 puits positifs par transfection ont alors été amplifiés en présence de généticine pendant 6 passages pour obtenir une quantité suffisante de cellules pour congélation. Au sixième passage, l'expression de la protéine Tat a été vérifiée par immunotransfert (western blot) pour chaque clone.

Amorces d'extrémité, 1 ^{er} cycle	Séquence
E5'	5'- GAA TTC ATG GAG CCA GTA GAT C- 3'
E3'	5'- AGA TCT CTA ATC GAC CGG ATC- 3'
Amorces d'extrémité, 2 ^{ème} cycle	
EcoR I	5'- AAA GAA TTC ATG GAG CCA GTA GAT CC- 3'
E6854	5'- AAA GAT CTC TAA TCG ACC GGA TCT GTC TCT GTC TC- 3'
Sal I	5'- AAG TCG ACC TAA TCG ACC GGA TCT GTC TCT GTC TC- 3'
Amorces internes	
W11F (M5')	5'- CCA GTA GAT CCT AAA CTA GAG CCC TTC AAG CAT CCA G- 3'
C27S (M5')	5'- ACA ATT GCT ATT CGA AAA AGT G- 3'
C27S (M3')	5'- CAC TTT TTC GAA TAG CAA TTG T- 3'
K50R (M5')	5'- ATC TCA TAT GGC AGG CGG AAG -3'
K50R (M3')	5'- CTT CCG CCT GCC ATA TGA GAT -3'
K51T (M5')	5'- GGC AGG AAG ACC CGG AGA CAG C- 3'
K51T (M3')	5'- GCT GTC TCC GGG TCT TCC TGC C- 3'
R52L (M5')	5'- GGC AGG AAG AAG CTT AGA CAG CGA CGA AGA TC -3'
R52L (M3')	5'- GAT CTT CGT CGC TGT CTA AGC TTC TTC CTG CC- 3'
R55L (M5')	5'- GGC AGG AAG AAG CGG AGA CAG CTG CGA AGA TC- 3'
R55L (M3')	5'- GAT CTT CGC AGC TGT CTC CGC TTC TTC CTG CC- 3'
R57L (M5')	5'- GAC AGC GAC GAC TAT CTC CTC AAG AC -3'
R57L (M3')	5'- GTC TTG AGG AGA TAG TCG TCG CTG TC- 3'
G79A (M5')	5'- CAG CCC CGA GCG GAT CCG ACA GG- 3'
G79A (M3')	5'- CCT GTC GGA TCC GCT CGG GGC TG- 3'
K89L (M3')	5'- CTG TCT CTG TCT CTC TCT CCA CCT TAA GCT TCG ATT CC- 3'
E92Q (M3')	5'- CTG TCT CTG TCT CTC TTT GCA CCT TCT TCT TCG AAT CC- 3'
R52L-R55L (M5')	5'- GGC AGG AAG AAG CTT AGA CAG CTG CGA AGA TC - 3'
R52L-R55L (M3')	5'- GAT CTT CGC AGC TGT CTA AGC TTC TTC CTG CC - 3'
R55L-R57L (M5')	5'- GAA GCG GAG ACA GCT GCG ACT ATC TCC TCA AGA C -3'
R55L-R57L (M3')	5'- GTC TTG AGG AGA TAG TCG CAG CTG TCT CCG CTT C -3'

TABLEAU 1

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Albini, A., G. Barillari, R. Benelli, R. C. Gallo, and B. Ensoli. 1995.
 5 Angiogenic properties of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:4838-4842.

2. Albini, A., R. Soldi, D. Giunciuglio, E. Giraudo, R. Benelli, L. Primo, D. Noonan, M. Salio, G. Camussi, W. Rockl, and F. Bussolino. 1996. The angiogenesis
 10 induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk- 1/KDR receptor on vascular endothelial cells. *Nat Med*. 2:1371-5.

3. Bartz, S. R., and M. Emerman. 1999. Human Immunodeficiency Virus type 1
 15 Tat induces apoptosis and increases sensitivity to apoptotic signals by up-regulating FLICE/Caspase-8. *J Virol*. 73:1956-1963.

4. Cafaro, A., A. Caputo, C. Fracasso, M. T. Maggiorella, D. Goletti, S. Baroncelli, M. Pace, L. Sernicola, M. L. Koanga-Mogtomo, M. Beti, A. Borsetti, R. Belli, L. Akerblom, F. Corrias, S. Butto, J. Heeney, P. Verani, F. Titti, and B.
 20 Ensoli. 1999. Control of SVIH-89.6P-infection of cynomolgus monkeys by HIV-1 Tat protein vaccine. *Nat Med*. 5:643-650.

5. Cafaro, A., A. Caputo, M. T. Maggiorella, S. Baroncelli, C. Fracasso, M. Pace, A. Borsetti, L. Sernicola, D. R. Negri, P. Ten Haaf, M. Betti, Z. Michelini, I.
 25 Macchia, E. Fanales-Belasio, R. Belli, F. Corrias, S. Butto, P. Verani, F. Titti, and B. Ensoli. 2000. SHIV89.6P pathogenicity in cynomolgus monkeys and control of viral replication and disease onset by human immunodeficiency virus type 1 Tat vaccine. *J Med Primatol*. 29:193-208.

6. Cafaro, A., F. Titti, C. Fracasso, M. T. Maggiorella, S. Baroncelli, A. Caputo, D. Goletti, A. Borsetti, M. Pace, E. Fanales-Belasio, B. Ridolfi, D. R. Negri, L. Sernicola, R. Belli, F. Corrias, I. Macchia, P. Leone, Z. Michelini, P. ten Haaf, S. Butto, P. Verani, and B. Ensoli. 2001. Vaccination with DNA containing tat coding
 30

sequences and unmethylated CpG motifs protects cynomolgus monkeys upon infection with simian/human immunodeficiency virus (SHIV89.6P). *Vaccine*. 19:2862-77.

7. Cullen, B. R. 1992. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiol Rev*. 56:375-394.

8. Felber, B. K., and G. N. Pavlakis. 1988. A quantitative bioassay for HIV-1 based on trans-activation. *Science*. 239:184-187.

9. Frankel, A. D., and C. O. Pabo. 1988. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*. 55:1189-1193.

10. Gringeri, A., E. Santagostino, M. Muca-Perja, H. Le Buanec, B. Bizzini, A. Lachgar, J. F. Zagury, J. Rappaport, A. Burny, R. C. Gallo, and D. Zagury. 1999. Tat toxoid as a component of a preventive vaccine in seronegative subjects. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum Retrovirol*. 20:371-375.

11. Groenink, M., A. C. Andeweg, R. A. Fouchier, S. Broersen, R. C. van der Jagt, H. Schuitemaker, R. E. de Goede, M. L. Bosch, H. G. Huisman, and M. Tersmette. 1992. Phenotype-associated env gene variation among eight related human immunodeficiency virus type 1 clones: evidence for in vivo recombination and determinants of cytotropism outside the V3 domain. *J Virol*. 66:6175-6180.

12. Guillon, C., F. Bedin, R. A. M. Fouchier, H. Schuitemaker, and R. A. Gruters. 1995. Completion of nucleotide sequences of non-syncytium-inducing and syncytium-inducing HIV type 1 variants isolated from the same patient. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 11:1537-1538.

13. Hauber, J., M. H. Malim, and B. R. Cullen. 1989. Mutational analysis of the conserved basic domain of human immunodeficiency virus Tat protein. *J Virol*. 63:1181-1187.

14. **Helland, D. E., J. L. Welles, A. Caputo, and W. A. Haseltine.** 1991. Transcellular transactivation by the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *J Virol.* **65**:4547-4549.

5 15. **Higuchi, R.** 1990. Recombinant PCR, p. 177-183. *In* M. A. Innis, Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (ed.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., San Diego, CA.

10 16. **Howcroft, T. K., K. Strebel, M. A. Martin, and D. S. Sinder.** 1993. Repression of MHC class I gene promoter activity by two-exon Tat of HIV. *Science.* **260**:1320-1322.

15 17. **Jeang, K.-T.** 1996. VIH-1 Tat: structure and function, p. 3-18. *In* G. Myers and B. Foley and J. W. Mellors and B. Korber and K. T. Jeang and S. Wain-Hobson (ed.), Human retroviruses and AIDS 1996: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los alamos National Laboratory, Los Alamos.

20 18. **Jeang, K. T., H. Xiao, and E. A. Rich.** 1999. Multifaceted activities of the VIH-1 transactivator of transcription, Tat. *J Biol Chem.* **274**:28837-28840.

 19. **Meyaard, L., S. A. Otto, H. Schuitemaker, and F. Miedema.** 1992. Effects of VIH-1 Tat protein on human T-cell proliferation. *Eur J Immunol.* **22**:2729-2732.

25 20. **Mitola, S., R. Soldi, I. Zanon, L. Barra, M. I. Gutierrez, B. Berkhout, M. Giacca, and F. Bussolino.** 2000. Identification of specific molecular structures of human immunodeficiency virus type 1 Tat relevant for its biological effects on vascular endothelial cells. *J Virol.* **74**:344-53.

30 21. **Osterhaus, A. D. M. E., C. A. van Baalen, R. A. Gruters, M. Schutten, C. H. Siebelink, E. G. Hulskotte, E. J. Tijhaar, R. E. Randall, G. van Amerongen, A. Fleuchaus, V. Erfle, and G. Sutter.** 1999. Vaccination with Rev and Tat against AIDS. *Vaccine.* **17**:2713-2714.

22. Ott, M., S. Emiliani, C. Van Lint, G. Herbein, J. Lovett, N. Chirmule, T. McCloskey, S. Pabwa, and E. Verdin. 1997. Immune hyperactivation of HIV-1-infected T cells mediated by Tat and the CD28 pathway. *Science*. **275**:1481-1485.

5

23. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

10

24. Seed, B., and J. Sheen. 1988. A simple phase extraction assay for chloramphenicol acetyltransferase activity. *Gene*. **67**:271-277.

25. Stauber, R. H., and G. N. Pavlakis. 1998. Intracellular trafficking and interactions of the HIV-1 Tat protein. *Virology*. **252**:126-136.

15

26. van Baalen, C. A., O. Pontesilli, R. C. Huisman, A. M. Geretti, M. R. Klein, F. de Wolf, F. Miedema, R. A. Gruters, and A. D. M. E. Osterhaus. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 Rev- and Tat-specific cytotoxic T lymphocyte frequencies inversely correlate with rapid progression to AIDS. *J Gen Virol*. **78**:1913-1918.

20

27. Wender, P. A., D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman, and J. B. Rothbard. 2000. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**:13003-13008.

25

28. Westendorp, M. O., R. Frank, C. Oschenbauer, K. Stricker, J. Dhein, H. Walczak, K. M. Debatin, and P. H. Krammer. 1995. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by VIH-1 Tat and gp120. *Nature*. **375**:497-500.

30

29. Westendorp, M. O., M. Li-Weber, R. W. Frank, and P. H. Krammer. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 Tat upregulates interleukin-2 secretion in

activated T cells. J. Virol. 68:4177-4185.

30. Zauli, G., D. Gibellini, D. Milani, M. Mazzoni, P. Borgatti, M. La Placa, and S. Capitani. 1993. Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein protects lymphoid, epithelial, and neuronal cell lines from death by apoptosis. Cancer Res. 53:4481-4485.

31. Mayhood T, Kaushik N, Pandey PK, Kashanchi F, Deng L, Pandey VN. 2000. Inhibition of Tat-mediated transactivation of HIV-1 LTR transcription by polyamide nucleic acid targeted to TAR hairpin element. Biochemistry, 39, 11532-11539.

32. Tyagi M., Rusnati M., Presta M., Giacca M. 2001. Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. J. Biol. Chem., 276, 3254-3261.

33. Stauber RH, Pavlakis GN. 1998. Intracellular trafficking and interactions of the HIV-1 Tat protein. Virology, 252, 126-136.

34. Endo S., Kubota S., Siomi H., Adachi A., Oroszlan S., Maki M., Hatanaka M. 1989. A region of basic amino-acid cluster in HIV-1 Tat protein is essential for trans-acting activity and nucleolar localization. Virus Genes, 3, 99-110.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un procédé de mutation de protéine, pour la préparation de mutants détoxifiés et immunogènes de la protéine Tat de type sauvage.

2. Procédé de préparation de mutants détoxifiés et immunogènes de la protéine Tat sauvage caractérisé en ce qu'il comprend :

– une étape de préparation de mutants de la protéine Tat de type sauvage, notamment par mutation de l'acide nucléique codant pour la protéine Tat de type sauvage,

– une étape de criblage des mutants détoxifiés caractérisés par une absence d'activité transcellulaire et une altération de la localisation nucléaire, et éventuellement par une absence d'activité transactivatrice, et

– une étape de criblage des mutants immunogènes caractérisés par leur capacité à induire des anticorps dirigés à la fois contre lesdits mutants et la protéine Tat sauvage, l'ordre des deux dernières étapes pouvant être inversé.

3. Mutant détoxifié et immunogène de la protéine Tat du virus VIH-1 caractérisé en ce qu'il comporte au moins deux mutations dans les régions 4 et/ou 5 de la protéine Tat de type sauvage.

4. Mutant selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une mutation dans la région 4.

5. Mutant selon l'une des revendications 3 ou 4, caractérisé en ce que les mutations dans les domaines 4 et/ou 5 sont susceptibles de conférer l'une au moins des propriétés suivantes :

- l'abrogation de l'effet transcellulaire de la protéine Tat de type sauvage,
- l'altération de la localisation nucléaire de la protéine Tat de type sauvage.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un procédé de mutation de protéine, pour la préparation de mutants détoxifiés et immunogènes de la protéine Tat de type sauvage.

5

2. Procédé de préparation de mutants détoxifiés et immunogènes de la protéine Tat sauvage caractérisé en ce qu'il comprend :

— une étape de préparation de mutants de la protéine Tat de type sauvage, notamment par mutation de l'acide nucléique codant pour la protéine Tat de type sauvage,

10

— une étape de criblage des mutants détoxifiés caractérisés par une absence d'activité transcellulaire et une altération de la localisation nucléaire, et éventuellement par une absence d'activité transactivatrice, et

— une étape de criblage des mutants immunogènes caractérisés par leur capacité à induire des anticorps dirigés à la fois contre lesdits mutants et la protéine Tat sauvage, l'ordre des deux dernières étapes pouvant être inversé.

15

3. Mutant détoxifié et immunogène de la protéine Tat du virus VIH-1 caractérisé en ce qu'il comporte au moins deux mutations dans les régions 4 et/ou 5 de la protéine Tat de type sauvage.

20

4. Mutant selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une mutation dans la région 4.

25

5. Mutant selon l'une des revendications 3 ou 4, caractérisé en ce que les mutations dans les domaines 4 et/ou 5 sont susceptibles de conférer l'une au moins des propriétés suivantes :

- l'abrogation de l'effet transcellulaire de la protéine Tat de type sauvage,
- l'altération de la localisation nucléaire de la protéine Tat de type sauvage.

30

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un procédé de mutation de protéine, pour la préparation de mutants détoxifiés et immunogènes de la protéine Tat de type sauvage du virus VIH-1.

5

2. Procédé de préparation de mutants détoxifiés et immunogènes de la protéine Tat sauvage du virus VIH-1 caractérisé en ce qu'il comprend :

— une étape de préparation de mutants de la protéine Tat de type sauvage, notamment par mutation de l'acide nucléique codant pour la protéine Tat de type sauvage,

10

— une étape de criblage des mutants détoxifiés caractérisés par une absence d'activité transcellulaire et une altération de la localisation nucléaire, et éventuellement par une absence d'activité transactivatrice, et

— une étape de criblage des mutants immunogènes caractérisés par leur capacité à induire des anticorps dirigés à la fois contre lesdits mutants et la protéine Tat sauvage, l'ordre des deux dernières étapes pouvant être inversé.

15

3. Mutant détoxifié et immunogène de la protéine Tat du virus VIH-1 caractérisé en ce qu'il comporte au moins deux mutations dans les régions 4 et/ou 5 de la protéine Tat de type sauvage.

20

4. Mutant selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une mutation dans la région 4.

5. Mutant selon l'une des revendications 3 ou 4, caractérisé en ce que les mutations dans les domaines 4 et/ou 5 sont susceptibles de conférer l'une au moins des propriétés suivantes :

25

- l'abrogation de l'effet transcellulaire de la protéine Tat de type sauvage,
- l'altération de la localisation nucléaire de la protéine Tat de type sauvage.

30

6. Mutant selon l'une des revendications 3 à 5, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation additionnelle susceptible de conférer une perte de l'activité transactivatrice de la protéine Tat de type sauvage.

5 7. Mutant selon l'une des revendications 3 à 6, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation dans la région N-terminale du domaine 4 de la protéine Tat de type sauvage, notamment dans la partie délimitée de l'acide aminé en position 49 à l'acide aminé en position 57.

10 8. Mutant selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation dans la région N-terminale du domaine 4 de la protéine Tat de type sauvage dans la partie délimitée de l'acide aminé en position 49 à l'acide aminé en position 55.

15 9. Mutant selon l'une des revendications 3 à 8, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation dans l'une au moins des régions suivantes dans le domaine 5 de la protéine Tat de type sauvage :

- le motif RGD,
- la région 88-92, de préférence en positions 89 et/ou 92.

20 10. Mutant selon l'une des revendications 3 à 9, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation dans le domaine 2 de la protéine Tat de type sauvage, notamment le remplacement de l'une quelconque des cystéines, avantageusement par une sérine.

25 11. Mutant selon l'une des revendications 3 à 10, caractérisé en ce qu'il comporte l'une au moins des mutations suivantes :

- remplacement en position 27 d'une cystéine par une sérine,
- remplacement en position 51 d'une lysine par une thréonine,
- remplacement en position 52 d'une arginine par une leucine,
- remplacement en position 55 d'une arginine par une leucine,
- 30 – remplacement en position 57 d'une arginine par une leucine,
- remplacement en position 79 d'une glycine par une alanine,
- remplacement en position 89 d'une lysine par une leucine,

6. Mutant selon l'une des revendications 3 à 5, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation additionnelle susceptible de conférer une perte de l'activité transactivatrice de la protéine Tat de type sauvage.

5 7. Mutant selon l'une des revendications 3 à 6, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation dans la région N-terminale du domaine 4 de la protéine Tat de type sauvage, notamment dans la partie délimitée de l'acide aminé en position 49 à l'acide aminé en position 57.

10 8. Mutant selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation dans la région N-terminale du domaine 4 de la protéine Tat de type sauvage dans la partie délimitée de l'acide aminé en position 49 à l'acide aminé en position 55.

15 9. Mutant selon l'une des revendications 3 à 8, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation dans l'une au moins des régions suivantes dans le domaine 5 de la protéine Tat de type sauvage :

- le motif RGD,
- la région 88-92, de préférence en positions 89 et/ou 92.

20 10. Mutant selon l'une des revendications 3 à 9, caractérisé en ce qu'il comporte une mutation dans le domaine 2 de la protéine Tat de type sauvage, notamment le remplacement de l'une quelconque des cystéines, avantageusement par une sérine.

25 11. Mutant selon l'une des revendications 3 à 10, caractérisé en ce qu'il comporte l'une au moins des mutations suivantes :

- remplacement en position 27 d'une cystéine par une sérine,
- remplacement en position 51 d'une lysine par une thréonine,
- remplacement en position 52 d'une arginine par une leucine,
- remplacement en position 55 d'une arginine par une leucine,
- 30 – remplacement en position 57 d'une arginine par une leucine,
- remplacement en position 79 d'une glycine par une alanine,
- remplacement en position 89 d'une lysine par une leucine,

— remplacement en position 92 d'un acide glutamique par une glutamine.

12. Mutant selon l'une des revendications 3 à 11, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant deux mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

K51T-R52L

K51T-R55L

K51T-R57L

K51T-G79A

K51T-K89L

K51T-E92Q

R52L-R55L

R52L-R57L

R52L-G79A

R52L-K89L

R52L-E92Q

R55L-R57L

R55L-G79A

R55L-K89L

R55L-E92Q

R57L-G79A

R57L-K89L

R57L-E92Q

G79A-K89L

G79A-E92Q

K89L-E92Q

– remplacement en position 92 d'un acide glutamique par une glutamine.

12. Mutant selon l'une des revendications 3 à 11, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant deux mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

K51T-R52L (SEQ ID NO : 2)

10 ~~K51T-R55L (SEQ ID NO : 3)~~

K51T-R57L (SEQ ID NO : 4)

K51T-G79A (SEQ ID NO : 5)

K51T-K89L (SEQ ID NO : 6)

K51T-E92Q (SEQ ID NO : 7)

15 R52L-R55L (SEQ ID NO : 8)

R52L-R57L (SEQ ID NO : 9)

R52L-G79A (SEQ ID NO : 10)

R52L-K89L (SEQ ID NO : 11)

R52L-E92Q (SEQ ID NO : 12)

20 R55L-R57L (SEQ ID NO : 13)

R55L-G79A (SEQ ID NO : 14)

R55L-K89L (SEQ ID NO : 15)

R55L-E92Q (SEQ ID NO : 16)

R57L-G79A (SEQ ID NO : 17)

25 R57L-K89L (SEQ ID NO : 18)

R57L-E92Q (SEQ ID NO : 19)

G79A-K89L (SEQ ID NO : 20)

G79A-E92Q (SEQ ID NO : 21)

K89L-E92Q (SEQ ID NO : 22)

13. Mutant selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

K51T-R55L

R52L-R55L

5 R52L-G79A

R55L-R57L

G79A-K89L

10 14. Mutant selon l'une des revendications 3 à 11, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant trois mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

15 C27S-K51T-R52L

C27S-K51T-R55L

C27S-K51T-R57L

C27S-K51T-G79A

C27S-K51T-K89L

20 C27S-K51T-E92Q

C27S-R52L-R55L

C27S-R52L-R57L

C27S-R52L-G79A

C27S-R52L-K89L

25 C27S-R52L-E92Q

C27S-R55L-R57L

C27S-R55L-G79A

C27S-R55L-K89L

C27S-R55L-E92Q

30 C27S-R57L-G79A

C27S-R57L-K89L

C27S-R57L-E92Q

13. Mutant selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

5	K51T-R55L	(SEQ ID NO : 3)
	R52L-R55L	(SEQ ID NO : 8)
	R52L-G79A	(SEQ ID NO : 10)
	R55L-R57L	(SEQ ID NO : 13)
	G79A-K89L	(SEQ ID NO : 20)

14. Mutant selon l'une des revendications 3 à 11, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant trois mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

15	C27S-K51T-R52L	(SEQ ID NO : 23)
	C27S-K51T-R55L	(SEQ ID NO : 24)
	C27S-K51T-R57L	(SEQ ID NO : 25)
	C27S-K51T-G79A	(SEQ ID NO : 26)
	C27S-K51T-K89L	(SEQ ID NO : 27)
20	C27S-K51T-E92Q	(SEQ ID NO : 28)
	C27S-R52L-R55L	(SEQ ID NO : 29)
	C27S-R52L-R57L	(SEQ ID NO : 30)
	C27S-R52L-G79A	(SEQ ID NO : 31)
	C27S-R52L-K89L	(SEQ ID NO : 32)
25	C27S-R52L-E92Q	(SEQ ID NO : 33)
	C27S-R55L-R57L	(SEQ ID NO : 34)
	C27S-R55L-G79A	(SEQ ID NO : 35)
	C27S-R55L-K89L	(SEQ ID NO : 36)
	C27S-R55L-E92Q	(SEQ ID NO : 37)
30	C27S-R57L-G79A	(SEQ ID NO : 38)
	C27S-R57L-K89L	(SEQ ID NO : 39)
	C27S-R57L-E92Q	(SEQ ID NO : 40)

C27S-G79A-K89L

C27S-G79A-E92Q

C27S-K89L-E92Q

5 15. Mutant selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

C27S-K51T-R55L

C27S-R52L-R55L

C27S-R52L-G79A

10

16. Mutant selon l'une des revendications 3 à 11, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant quatre mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

15

C27S-K51T-R52L-G79A

C27S-K51T-R52L-K89L

C27S-K51T-R52L-E92Q

20

C27S-K51T-R55L-G79A

C27S-K51T-R55L-K89L

C27S-K51T-R55L-E92Q

C27S-K51T-R57L-G79A

C27S-K51T-R57L-K89L

25

C27S-K51T-R57L-E92Q

C27S-K51T-G79A-K89L

C27S-K51T-G79A-E92Q

C27S-K51T-K89L-E92Q

C27S-R52L-G79A-K89L

30

C27S-R52L-G79A-E92Q

C27S-R52L-K89L-E92Q

C27S-R52L-R55L-G79A

C27S-G79A-K89L	(SEQ ID NO : 41)
C27S-G79A-E92Q	(SEQ ID NO : 42)
C27S-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 43)

5 15. Mutant selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

C27S-K51T-R55L	(SEQ ID NO : 24)
C27S-R52L-R55L	(SEQ ID NO : 29)
C27S-R52L-G79A	(SEQ ID NO : 31)

10

16. Mutant selon l'une des revendications 3 à 11, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant quatre mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

	C27S-K51T-R52L-G79A	(SEQ ID NO : 44)
	C27S-K51T-R52L-K89L	(SEQ ID NO : 45)
	C27S-K51T-R52L-E92Q	(SEQ ID NO : 46)
20	C27S-K51T-R55L-G79A	(SEQ ID NO : 47)
	C27S-K51T-R55L-K89L	(SEQ ID NO : 48)
	C27S-K51T-R55L-E92Q	(SEQ ID NO : 49)
	C27S-K51T-R57L-G79A	(SEQ ID NO : 50)
	C27S-K51T-R57L-K89L	(SEQ ID NO : 51)
25	C27S-K51T-R57L-E92Q	(SEQ ID NO : 52)
	C27S-K51T-G79A-K89L	(SEQ ID NO : 53)
	C27S-K51T-G79A-E92Q	(SEQ ID NO : 54)
	C27S-K51T-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 55)
	C27S-R52L-G79A-K89L	(SEQ ID NO : 56)
30	C27S-R52L-G79A-E92Q	(SEQ ID NO : 57)
	C27S-R52L-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 58)
	C27S-R52L-R55L-G79A	(SEQ ID NO : 59)

C27S-R52L-R55L-K89L

C27S-R52L-R55L-E92Q

C27S-R52L-R57L-G79A

C27S-R52L-R57L-K89L

5

C27S-R52L-R57L-E92Q

C27S-R55L-G79A-K89L

C27S-R55L-G79A-E92Q

C27S-R55L-K89L-E92Q

C27S-R55L-R57L-G79A

10

C27S-R55L-R57L-K89L

C27S-R55L-R57L-E92Q

C27S-R57L-G79A-K89L

C27S-R57L-G79A-E92Q

C27S-R57L-K89L-E92Q

15

C27S-G79A-K89L-E92Q

17. Mutant selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

C27S-K51T-R55L-G79A

20

C27S-K51T-R55L-K89L

C27S-K51T-R55L-E92Q

C27S-R52L-R55L-G79A

18. Mutant selon l'une des revendications 3 à 11, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant cinq mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

30

C27S-K51T-G79A-K89L-E92Q

C27S-K51T-R52L-R55L-G79A

C27S-K51T-R52L-R55L-K89L

	C27S-R52L-R55L-K89L	(SEQ ID NO : 60)
	C27S-R52L-R55L-E92Q	(SEQ ID NO : 61)
	C27S-R52L-R57L-G79A	(SEQ ID NO : 62)
	C27S-R52L-R57L-K89L	(SEQ ID NO : 63)
5	C27S-R52L-R57L-E92Q	(SEQ ID NO : 64)
	C27S-R55L-G79A-K89L	(SEQ ID NO : 65)
	C27S-R55L-G79A-E92Q	(SEQ ID NO : 66)
	C27S-R55L-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 67)
	C27S-R55L-R57L-G79A	(SEQ ID NO : 68)
10	C27S-R55L-R57L-K89L	(SEQ ID NO : 69)
	C27S-R55L-R57L-E92Q	(SEQ ID NO : 70)
	C27S-R57L-G79A-K89L	(SEQ ID NO : 71)
	C27S-R57L-G79A-E92Q	(SEQ ID NO : 72)
	C27S-R57L-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 73)
15	C27S-G79A-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 74)

17. Mutant selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

	C27S-K51T-R55L-G79A	(SEQ ID NO : 47)
20	C27S-K51T-R55L-K89L	(SEQ ID NO : 48)
	C27S-K51T-R55L-E92Q	(SEQ ID NO : 49)
	C27S-R52L-R55L-G79A	(SEQ ID NO : 59)

18. Mutant selon l'une des revendications 3 à 11, caractérisé en ce qu'il est choisi par les mutants présentant cinq mutations telles qu'indiquées ci-après, chacune des mutations étant représentée par un triplet : lettre-chiffre-lettre, dont le chiffre indique la position de l'acide aminé muté, la lettre précédant le chiffre correspond à l'acide aminé sur lequel porte la mutation et la lettre suivant le chiffre correspond à l'acide aminé remplaçant l'acide aminé précédant le chiffre :

30	C27S-K51T-G79A-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 75)
	C27S-K51T-R52L-R55L-G79A	(SEQ ID NO : 76)
	C27S-K51T-R52L-R55L-K89L	(SEQ ID NO : 77)

C27S-K51T-R52L-R55L-E92Q
C27S-K51T-R52L-R57L-G79A
C27S-K51T-R52L-R57L-K89L
C27S-K51T-R52L-R57L-E92Q
5 C27S-K51T-R52L-G79A-K89L
C27S-K51T-R52L-G79A-E92Q
C27S-K51T-R52L-K89L-E92Q
C27S-K51T-R55L-R57L-G79A
C27S-K51T-R55L-R57L-K89L
10 C27S-K51T-R55L-R57L-E92Q
C27S-K51T-R55L-G79A-K89L
C27S-K51T-R55L-G79A-E92Q
C27S-K51T-R55L-K89L-E92Q
C27S-K51T-R57L-G79A-K89L
15 C27S-K51T-R57L-G79A-E92Q
C27S-K51T-R57L-K89L-E92Q
C27S-R52L-R55L-R57L-G79A
C27S-R52L-R55L-R57L-K89L
C27S-R52L-R55L-R57L-E92Q
20 C27S-R52L-R55L-G79A-K89L
C27S-R52L-R55L-G79A-E92Q
C27S-R52L-R55L-K89L-E92Q
C27S-R52L-R57L-G79A-K89L
C27S-R52L-R57L-G79A-E92Q
25 C27S-R52L-R57L-K89L-E92Q
C27S-R52L-G79A-K89L-E92Q
C27S-R55L-R57L-G79A-K89L
C27S-R55L-R57L-G79A-E92Q
C27S-R55L-R57L-K89L-E92Q
30 C27S-R55L-G79A-K89L-E92Q
C27S-R57L-G79A-K89L-E92Q

	C27S-K51T-R52L-R55L-E92Q	(SEQ ID NO : 78)
	C27S-K51T-R52L-R57L-G79A	(SEQ ID NO : 79)
	C27S-K51T-R52L-R57L-K89L	(SEQ ID NO : 80)
	C27S-K51T-R52L-R57L-E92Q	(SEQ ID NO : 81)
5	C27S-K51T-R52L-G79A-K89L	(SEQ ID NO : 82)
	C27S-K51T-R52L-G79A-E92Q	(SEQ ID NO : 83)
	C27S-K51T-R52L-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 84)
	C27S-K51T-R55L-R57L-G79A	(SEQ ID NO : 85)
	C27S-K51T-R55L-R57L-K89L	(SEQ ID NO : 86)
10	C27S-K51T-R55L-R57L-E92Q	(SEQ ID NO : 87)
	C27S-K51T-R55L-G79A-K89L	(SEQ ID NO : 88)
	C27S-K51T-R55L-G79A-E92Q	(SEQ ID NO : 89)
	C27S-K51T-R55L-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 90)
	C27S-K51T-R57L-G79A-K89L	(SEQ ID NO : 91)
15	C27S-K51T-R57L-G79A-E92Q	(SEQ ID NO : 92)
	C27S-K51T-R57L-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 93)
	C27S-R52L-R55L-R57L-G79A	(SEQ ID NO : 94)
	C27S-R52L-R55L-R57L-K89L	(SEQ ID NO : 95)
	C27S-R52L-R55L-R57L-E92Q	(SEQ ID NO : 96)
20	C27S-R52L-R55L-G79A-K89L	(SEQ ID NO : 97)
	C27S-R52L-R55L-G79A-E92Q	(SEQ ID NO : 98)
	C27S-R52L-R55L-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 99)
	C27S-R52L-R57L-G79A-K89L	(SEQ ID NO : 100)
	C27S-R52L-R57L-G79A-E92Q	(SEQ ID NO : 101)
25	C27S-R52L-R57L-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 102)
	C27S-R52L-G79A-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 103)
	C27S-R55L-R57L-G79A-K89L	(SEQ ID NO : 104)
	C27S-R55L-R57L-G79A-E92Q	(SEQ ID NO : 105)
	C27S-R55L-R57L-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 106)
30	C27S-R55L-G79A-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 107)
	C27S-R57L-G79A-K89L-E92Q	(SEQ ID NO : 108)

19. Mutant selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

C27S-K51T-R55L-G79A-K89L

C27S-K51T-R55L-G79A-E92Q

20. Séquences nucléotidiques codant pour l'un des mutants selon l'une des revendications 3 à 19.

21. Lignée cellulaire transfectée avec une séquence nucléotidique selon la revendication 20.

22. Anticorps dirigés contre l'un des mutants selon l'une quelconque des revendications 3 à 19.

23. Composition pharmaceutique, notamment vaccin, contenant à titre de substance active l'un au moins des mutants selon l'une des revendications 3 à 19 ou l'une au moins des séquences nucléotidiques selon la revendication 20, placé sous le contrôle d'éléments nécessaires à une expression constitutive de l'un des mutants selon l'une des revendications 3 à 19 ou l'un au moins des anticorps selon la revendication 22, en association avec un véhicule pharmaceutiquement approprié.

24. Composition diagnostique pour la détection et/ou la quantification du virus VIH-1 comprenant au moins un mutant tel que défini dans l'une des revendications 3 à 19, ou au moins un anticorps selon la revendication 22.

25. Procédé de détection et/ou de quantification du virus VIH-1 dans un échantillon biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté par le VIH-1, tel que plasma, sérum ou tissu, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

— mettre en contact ledit échantillon biologique avec une composition diagnostique comprenant un mutant tel que défini dans l'une des revendications 3 à 19 ou un anticorps selon la revendication 22, dans des conditions prédéterminées qui permettent, s'il y a lieu, la formation de complexes anticorps/antigène(s) entre le mutant

19. Mutant selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les mutants suivants :

C27S-K51T-R55L-G79A-K89L (SEQ ID NO : 88)

C27S-K51T-R55L-G79A-E92Q (SEQ ID NO : 89)

5

20. Séquences nucléotidiques codant pour l'un des mutants selon l'une des revendications 3 à 19.

21. Lignée cellulaire transfectée avec une séquence nucléotidique selon la revendication 20.

10

22. Anticorps dirigés contre l'un des mutants selon l'une quelconque des revendications 3 à 19.

15

23. Composition pharmaceutique, notamment vaccin, contenant à titre de substance active l'un au moins des mutants selon l'une des revendications 3 à 19 ou l'une au moins des séquences nucléotidiques selon la revendication 20, placé sous le contrôle d'éléments nécessaires à une expression constitutive de l'un des mutants selon l'une des revendications 3 à 19 ou l'un au moins des anticorps selon la revendication 22, en association avec un véhicule pharmaceutiquement approprié.

20

24. Composition diagnostique pour la détection et/ou la quantification du virus VIH-1 comprenant au moins un mutant tel que défini dans l'une des revendications 3 à 19, ou au moins un anticorps selon la revendication 22.

25

25. Procédé de détection et/ou de quantification du virus VIH-1 dans un échantillon biologique prélevé chez un individu susceptible d'être infecté par le VIH-1, tel que plasma, sérum ou tissu, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

30

– mettre en contact ledit échantillon biologique avec une composition diagnostique comprenant un mutant tel que défini dans l'une des revendications 3 à 19 ou un anticorps selon la revendication 22, dans des conditions prédéterminées qui

susdéfini et des anticorps dirigés contre la protéine Tat de type sauvage ou entre les anticorps susdéfinis et la protéine Tat de type sauvage, et

— détecter et/ou quantifier la formation desdits complexes par tout moyen approprié.

5

26. Utilisation d'au moins un mutant tel que défini dans l'une des revendications 3 à 19 ou d'au moins un anticorps tel que défini dans la revendication 22 pour le diagnostic *in vitro* du virus VIH-1 dans un échantillon ou prélèvement biologique.

10

27. Utilisation d'au moins un mutant tel que défini dans l'une des revendications 3 à 19 ou d'au moins un anticorps selon la revendication 22 pour la préparation d'une composition vaccinale.

15

permettent, s'il y a lieu, la formation de complexes anticorps/antigène(s) entre le mutant susdéfini et des anticorps dirigés contre la protéine Tat de type sauvage ou entre les anticorps susdéfinis et la protéine Tat de type sauvage, et

— détecter et/ou quantifier la formation desdits complexes par tout moyen approprié.

5

26. Utilisation d'au moins un mutant tel que défini dans l'une des revendications 3 à 19 ou d'au moins un anticorps tel que défini dans la revendication 22 pour le diagnostic *in vitro* du virus VIH-1 dans un échantillon ou prélèvement biologique.

10

27. Utilisation d'au moins un mutant tel que défini dans l'une des revendications 3 à 19 ou d'au moins un anticorps selon la revendication 22 pour la préparation d'une composition vaccinale.

15

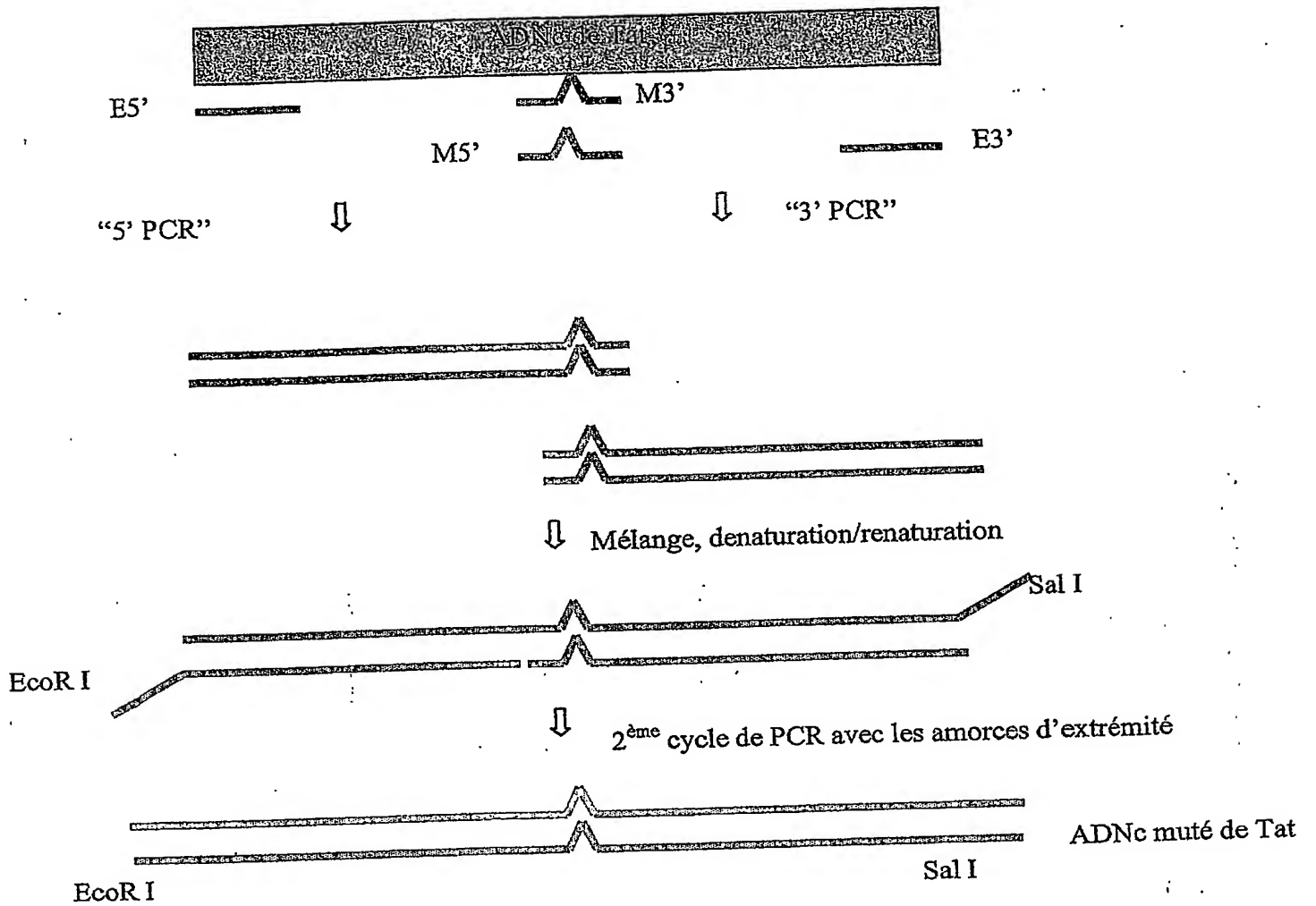


FIGURE 1

Alignement protéines TAT mutées

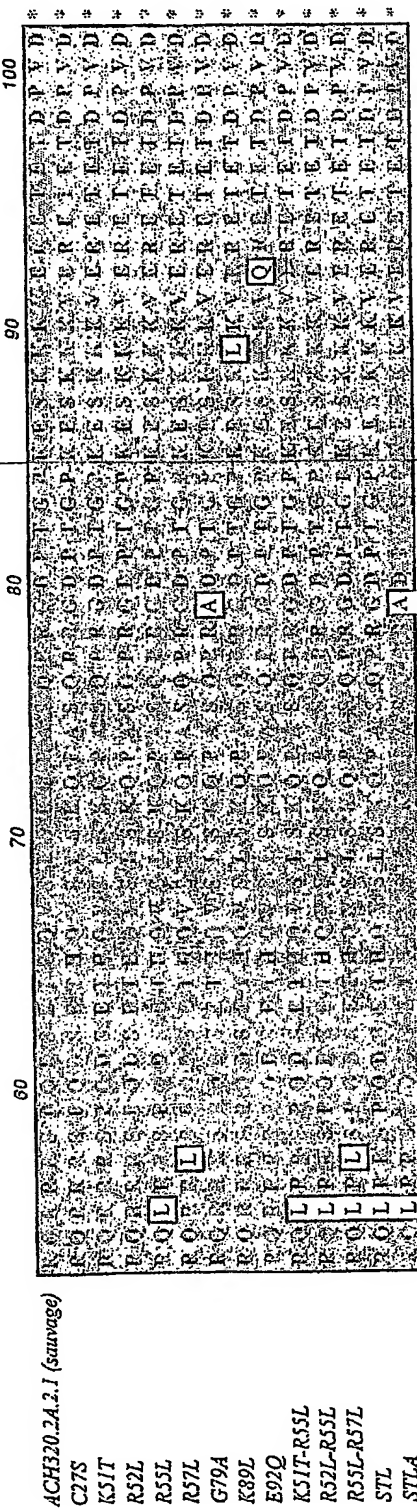
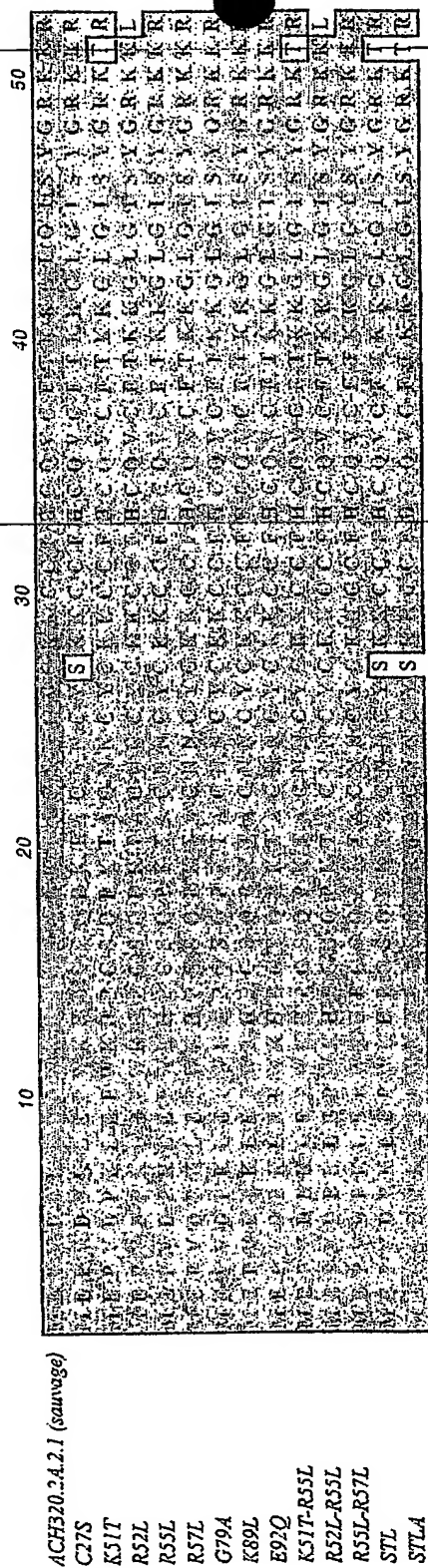


FIGURE 2

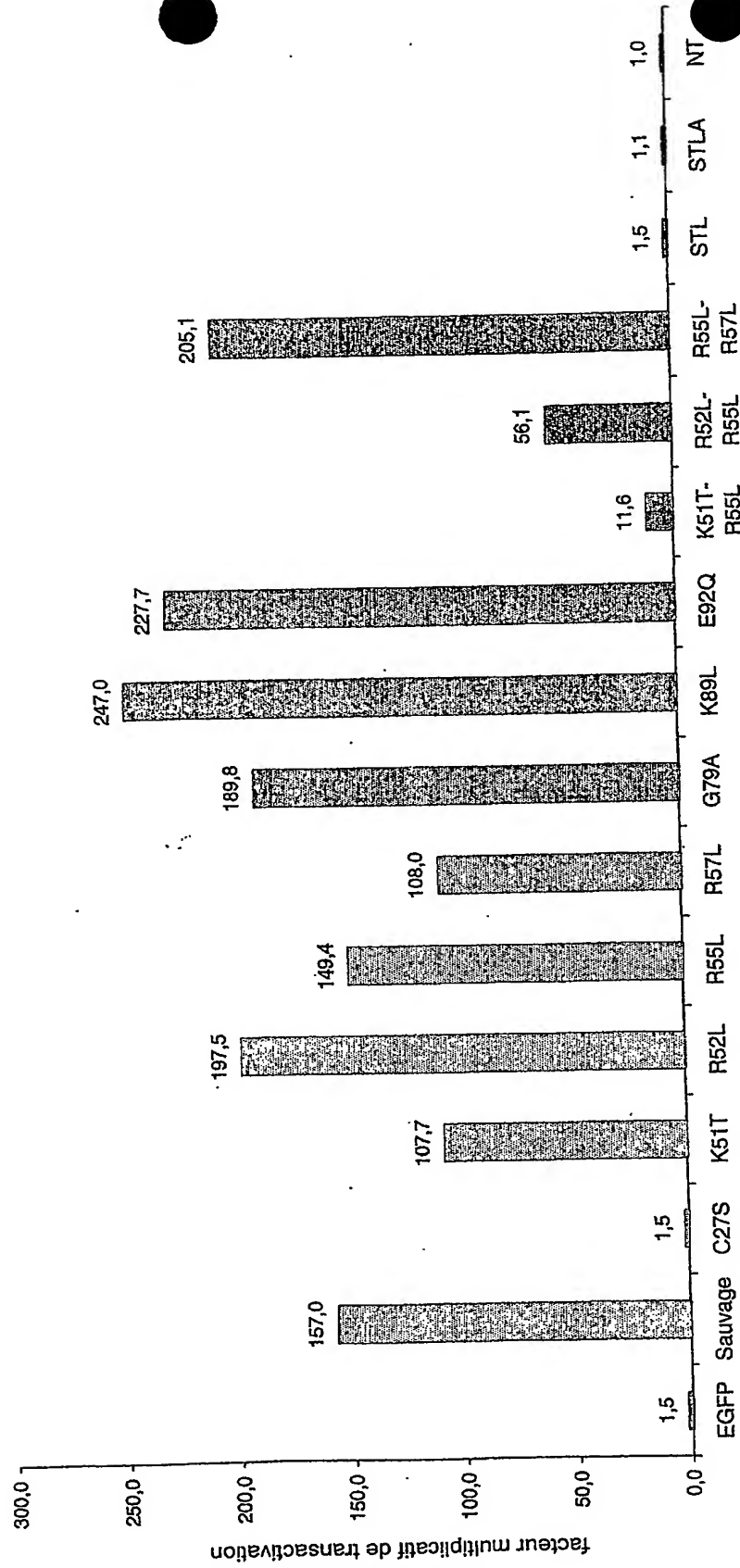
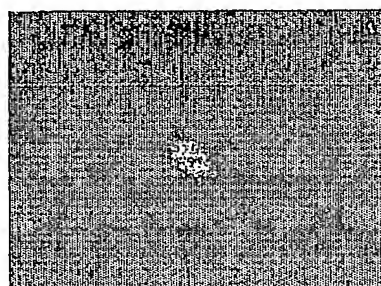
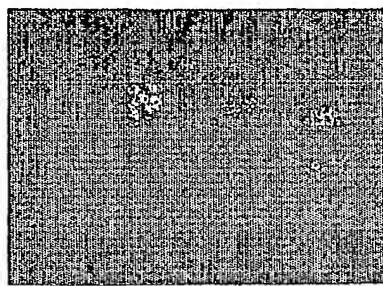
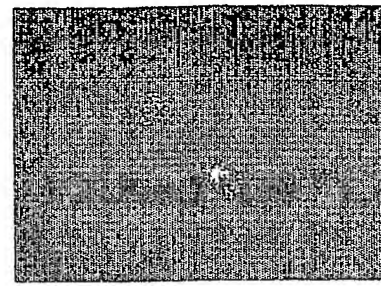


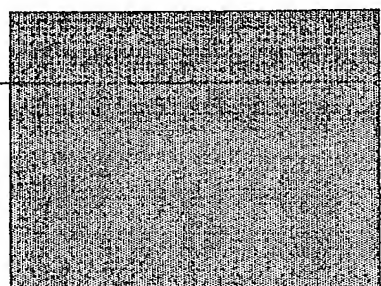
FIGURE 3



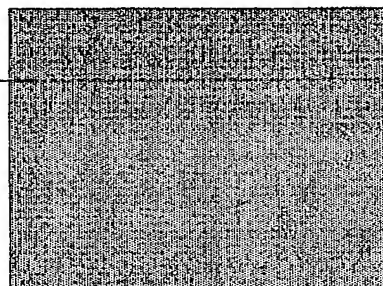
A) pEGFP

B) pEGFP-ACH320.2A.2.1
sauvage

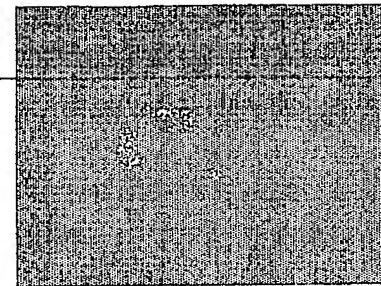
C) pEGFP-K51T



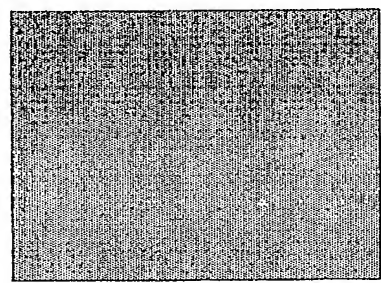
D) pEGFP-R52L



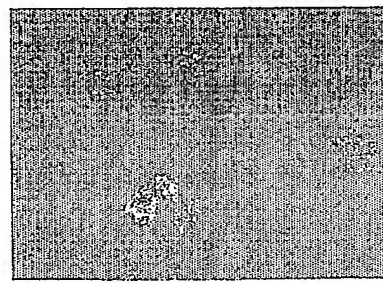
E) pEGFP-R55L



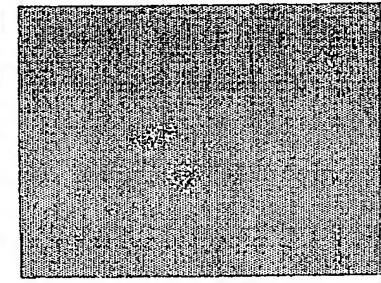
F) pEGFP-G79A



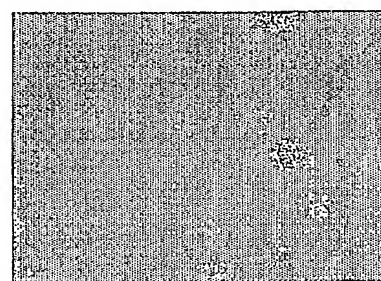
G) pEGFP-K89L



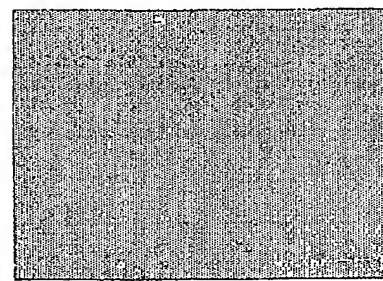
H) pEGFP-E92Q



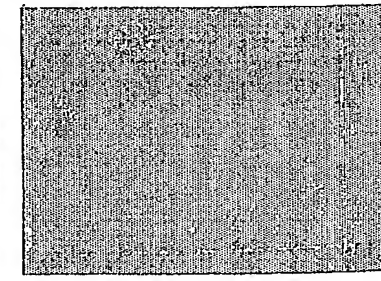
I) pEGFP-R52L-R55L



J) pEGFP-K51T-R55L



K) pEGFP-STL



L) pEGFP-STLA

FIGURE 4

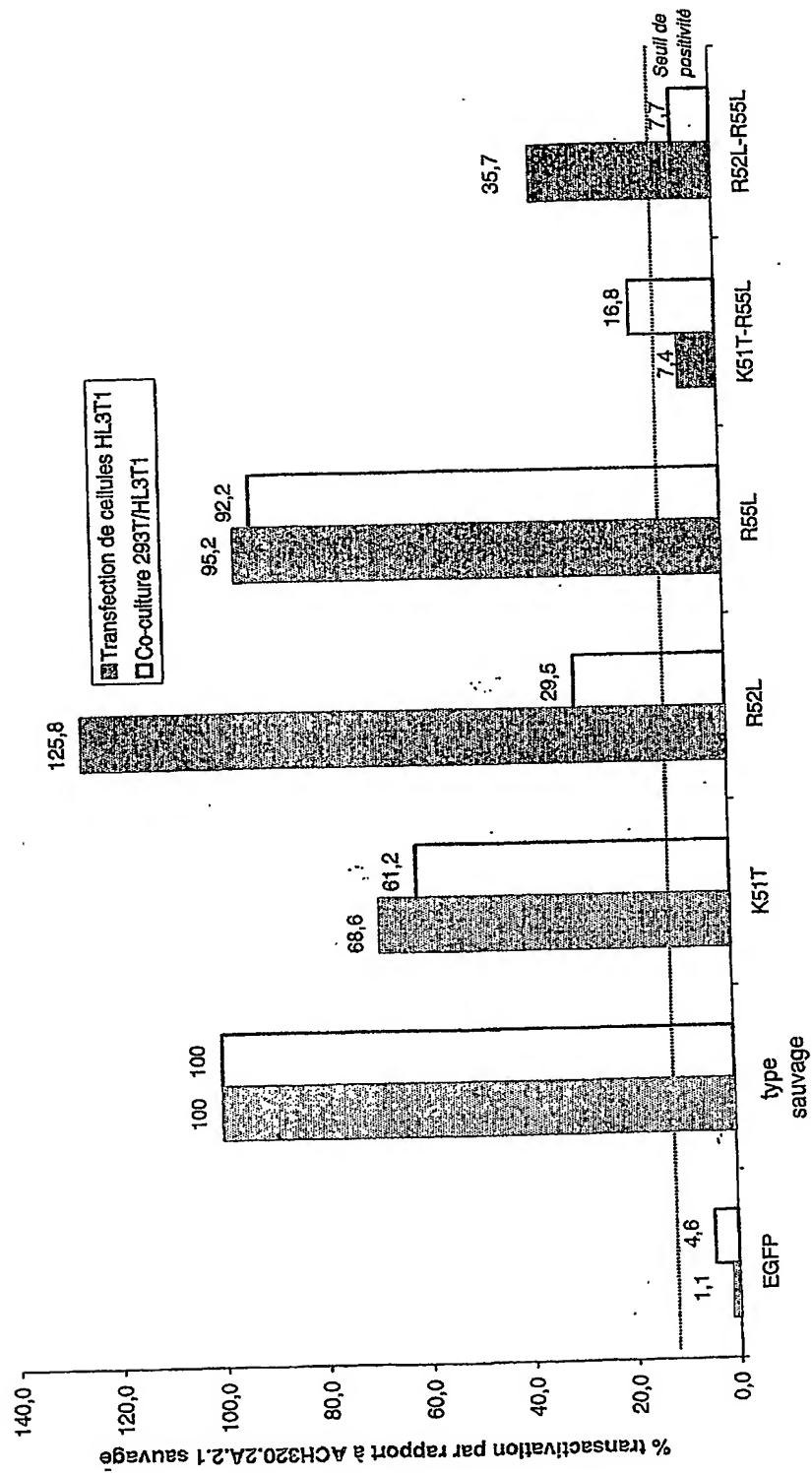


FIGURE 5

LISTE DE SÉQUENCES

<110> BIOMERIEUX SA

<120> MUTANTS DE LA PROTEINE TAT DU VIRUS VIH-1

<130> IFB 01 CE BIO MTAT

<140> FR 02/00319

<141> 2002-01-11

<160> 108

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 101

<212> PRT

<213> virus VIH-1

<400> 1

```

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
1          5          10          15
Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
          20          25          30
His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
          35          40          45
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
          50          55          60
His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
65          70          75          80
Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
          85          90          95
Thr Asp Pro Val Asp
          100

```

<210> 2

<211> 101

<212> PRT

<213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant K51T-R52L de la protéine Tat

<400> 2

```

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
1          5          10          15
Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
          20          25          30
His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
          35          40          45

```

Arg Lys Thr Leu Arg Gln Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Gl
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 3
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant K51T-R55L de la protéine Tat

<400> 3
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 4
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant K51T-R57L de la protéine Tat

<400> 4
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

~~Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr~~
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 5
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant K51T-G79A de la protéine Tat

<400> 5
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 6
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant K51T-K89L de la protéine Tat

<400> 6
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr
 35 40 45
 Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 7
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant K51T-E92Q de la protéine Tat

<400> 7
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 8
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant R52L-R55L de la protéine Tat

<400> 8
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

~~His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly~~
~~35 40 45~~
 Arg Lys Lys Leu Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 9
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant R52L-R57L de la protéine Tat

<400> 9
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 10
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant R52L-G79A de la protéine Tat

<400> 10
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys P
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 11
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant R52L-K89L de la protéine Tat

<400> 11
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 12
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant R52L-E92Q de la protéine Tat

<400> 12
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln	Pro	Lys	Thr	Ala	Cys	Asn	Asn	Cys	Tyr	Cys	Lys	Lys	Cys	Cys	Phe	
			20					25					30			
His	Cys	Gln	Val	Cys	Phe	Thr	Lys	Lys	Gly	Leu	Gly	Ile	Ser	Tyr	Gly	
		35					40					45				
Arg	Lys	Lys	Leu	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg	Ser	Pro	Gln	Asp	Ser	Glu	Thr	
	50					55					60					
His	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Lys	Gln	Pro	Ala	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Asp	
	65					70				75					80	
Pro	Thr	Gly	Pro	Lys	Glu	Ser	Lys	Lys	Lys	Val	Gln	Arg	Glu	Thr	Glu	
				85					90					95		
Thr	Asp	Pro	Val	Asp												
			100													

<210> 13
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant R55L-R57L de la protéine Tat

<400> 13

Met	Glu	Pro	Val	Asp	Pro	Lys	Leu	Glu	Pro	Trp	Lys	His	Pro	Gly	Ser	
1				5					10					15		
Gln	Pro	Lys	Thr	Ala	Cys	Asn	Asn	Cys	Tyr	Cys	Lys	Lys	Cys	Cys	Phe	
			20					25					30			
His	Cys	Gln	Val	Cys	Phe	Thr	Lys	Lys	Gly	Leu	Gly	Ile	Ser	Tyr	Gly	
		35					40					45				
Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Leu	Arg	Leu	Ser	Pro	Gln	Asp	Ser	Glu	Thr	
	50					55					60					
His	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Lys	Gln	Pro	Ala	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Asp	
	65					70				75					80	
Pro	Thr	Gly	Pro	Lys	Glu	Ser	Lys	Lys	Lys	Val	Glu	Arg	Glu	Thr	Glu	
				85					90					95		
Thr	Asp	Pro	Val	Asp												
			100													

<210> 14
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant R55L-G79A de la protéine Tat

<400> 14

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 15

<211> 101

<212> PRT

<213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant R55L-K89L de la protéine Tat

<400> 15

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 16

<211> 101

<212> PRT

<213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant R55L-E92Q de la protéine Tat

<400> 16

Met	Glu	Pro	Val	Asp	Pro	Lys	Leu	Glu	Pro	Trp	Lys	His	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Gln	Pro	Lys	Thr	Ala	Cys	Asn	Asn	Cys	Tyr	Cys	Lys	Lys	Cys	Cys	Phe
			20					25					30		
His	Cys	Gln	Val	Cys	Phe	Thr	Lys	Lys	Gly	Leu	Gly	Ile	Ser	Tyr	Gly
		35					40					45			
Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Leu	Arg	Arg	Ser	Pro	Gln	Asp	Ser	Glu	Thr
	50					55					60				
His	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Lys	Gln	Pro	Ala	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Asp
65					70					75					80
Pro	Thr	Gly	Pro	Lys	Glu	Ser	Lys	Lys	Lys	Val	Gln	Arg	Glu	Thr	Glu
				85					90					95	

Thr Asp Pro Val Asp
100

<210> 17

<211> 101

<212> PRT

<213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant R57L-G79A de la protéine Tat

<400> 17

Met	Glu	Pro	Val	Asp	Pro	Lys	Leu	Glu	Pro	Trp	Lys	His	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Gln	Pro	Lys	Thr	Ala	Cys	Asn	Asn	Cys	Tyr	Cys	Lys	Lys	Cys	Cys	Phe
			20					25					30		
His	Cys	Gln	Val	Cys	Phe	Thr	Lys	Lys	Gly	Leu	Gly	Ile	Ser	Tyr	Gly
		35					40					45			
Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Leu	Ser	Pro	Gln	Asp	Ser	Glu	Thr
	50					55					60				
His	Gln	Val	Ser	Leu	Ser	Lys	Gln	Pro	Ala	Ser	Gln	Pro	Arg	Ala	Asp
65					70					75					80
Pro	Thr	Gly	Pro	Lys	Glu	Ser	Lys	Lys	Lys	Val	Glu	Arg	Glu	Thr	Glu
				85					90					95	

Thr Asp Pro Val Asp
100

<210> 18

<211> 101

<212> PRT

<213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant R57L-K89L de la protéine Tat

<400> 18

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 19

<211> 101

<212> PRT

<213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant R57L-E92Q de la protéine Tat

<400> 19

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 20

<211> 101

<212> PRT

<213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant G79A-K89L de la protéine Tat

<400> 20

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

~~His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp~~
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 21

<211> 101

<212> PRT

<213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant G79A-E92Q de la protéine Tat

<400> 21

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 22

<211> 101

<212> PRT

<213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant K89L-E92Q de la protéine Tat

<400> 22

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
1 5 10 15
Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
20 25 30
His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
35 40 45
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
50 55 60
His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
65 70 75 80
Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
85 90 95
Thr Asp Pro Val Asp
100

<210> 23

<211> 101

<212> PRT

<213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant C27S-K51T-R52L de la protéine Tat

<400> 23

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
1 5 10 15
Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
20 25 30
His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
35 40 45
Arg Lys Thr Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
50 55 60
His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
65 70 75 80
Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
85 90 95
Thr Asp Pro Val Asp
100

<210> 24

<211> 101

<212> PRT

<213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant C27S-K51T-R55L de la protéine Tat

<400> 24

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 25

<211> 101

<212> PRT

<213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant C27S-K51T-R57L de la protéine Tat

<400> 25

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 26
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-G79A de la protéine Tat

<400> 26
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 27
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-K89L de la protéine Tat

<400> 27
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 28
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-E92Q de la protéine Tat

<400> 28
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 29
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R52L-R55L de la protéine Tat

<400> 29
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Leu Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 30
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R52L-R57L de la protéine Tat

<400> 30
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 31
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R52L-G79A de la protéine Tat

<400> 31
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 32
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R52L-K89L de la protéine Tat

<400> 32
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 33
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R52L-E92Q de la protéine Tat

<400> 33
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 34
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant C27S-R55L-R57L de la protéine Tat

<400> 34

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 35
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant C27S-R55L-G79A de la protéine Tat

<400> 35

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 36
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R55L-K89L de la protéine Tat

<400> 36
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 37
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R55L-E92Q de la protéine Tat

<400> 37
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 38
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R57L-G79A de la protéine Tat

<400> 38
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 39
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R57L-K89L de la protéine Tat

<400> 39
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 40
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R57L-E92Q de la protéine Tat

<400> 40
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 41
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-G79A-K89L de la protéine Tat

<400> 41
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 42
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-G79A-E92Q de la protéine Tat

<400> 42
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 43
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K89L-E92Q de la protéine Tat

<400> 43
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 44
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-R52L-G79A de la protéine Tat

<400> 44
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Thr Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 45
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-R52L-K89L de la protéine Tat

<400> 45
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Thr Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 46
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-R52L-E92Q de la protéine Tat

<400> 46
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Thr Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 47
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-R55L-G79A de la protéine Tat

<400> 47
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 48
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant C27S-K51T-R55L-K89L de la protéine Tat

<400> 48

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 49
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant C27S-K51T-R55L-E92Q de la protéine Tat

<400> 49

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 †

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

```
<210> 50
<211> 101
<212> PRT
<213> séquence artificielle
```

<220>

<223> mutant C27S-K51T-R57L-G79A de la protéine Tat

<4 00> 50

Met	Glu	Pro	Val	Asp	Pro	Lys	Leu	Glu	Pro	Trp	Lys	His	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
100

<210> 51

<211> 101

<212> PRT

<213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant C27S-K51T-R57L-K89L de la protéine Tat

<400> 51

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
100

<210> 52
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-R57L-E92Q de la protéine Tat

<400> 52
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 53
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-G79A-K89L de la protéine Tat

<400> 53
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 54
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-G79A-E92Q de la protéine Tat

<400> 54
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 55
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-K89L-E92Q de la protéine Tat

<400> 55
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 56
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant C27S-R52L-G79A-K89L de la protéine Tat

<400> 56

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 57
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant C27S-R52L-G79A-E92Q de la protéine Tat

<400> 57

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 58
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R52L-K89L-E92Q de la protéine Tat

<400> 58
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 59
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R52L-R55L-G79A de la protéine Tat

<400> 59
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Leu Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 60
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R52L-R55L-K89L de la protéine Tat

<400> 60
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 61
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R52L-R55L-E92Q de la protéine Tat

<400> 61
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Leu Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 62
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant C27S-R52L-R57L-G79A de la protéine Tat

<400> 62

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 63
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant C27S-R52L-R57L-K89L de la protéine Tat

<400> 63

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 64
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant C27S-R52L-R57L-E92Q de la protéine Tat

<400> 64

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 65
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant C27S-R55L-G79A-K89L de la protéine Tat

<400> 65

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 66
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R55L-G79A-E92Q de la protéine Tat

<400> 66
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe.
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 67
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R55L-K89L-E92Q de la protéine Tat

<400> 67
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 68
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R55L-R57L-G79A de la protéine Tat

<400> 68
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 69
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R55L-R57L-K89L de la protéine Tat

<400> 69
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 70
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R55L-R57L-E92Q de la protéine Tat

<400> 70
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 71
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R57L-G79A-K89L de la protéine Tat

<400> 71
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 72
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R57L-G79A-E92Q de la protéine Tat

<400> 72
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 73
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R57L-K89L-E92Q de la protéine Tat

<400> 73
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 74
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-G79A-K89L-E92Q de la protéine Tat

<400> 74
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 75
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-G79A-K89L-E92Q de la protéine Tat

<400> 75
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 76
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-R52L-R55L-G79A de la protéine Tat

<400> 76
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Thr Leu Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 77
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-R52L-R55L-K89L de la protéine Tat

<400> 77
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Thr Leu Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 78
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-R52L-R55L-E92Q de la protéine Tat

<400> 78
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Thr Leu Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 79
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-R52L-R57L-G79A de la protéine Tat

<400> 79
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Thr Leu Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 80
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-R52L-R57L-K89L de la protéine Tat

<400> 80
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Thr Leu Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 81
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-R52L-R57L-E92Q de la protéine Tat

<400> 81
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Thr Leu Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 82
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-R52L-G79A-K89L de la protéine Tat

<400> 82
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Thr Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 83
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-R52L-G79A-E92Q de la protéine Tat

<400> 83
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Thr Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 84
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant C27S-K51T-R52L-K89L-E92Q de la protéine Tat

<400> 84

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Thr Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 85
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant C27S-K51T-R55L-R57L-G79A de la protéine Tat

<400> 85

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 86
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-R55L-R57L-K89L de la protéine Tat

<400> 86
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 87
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-R55L-R57L-E92Q de la protéine Tat

<400> 87
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 88
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-R55L-G79A-K89L de la protéine Tat

<400> 88
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 89
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-K51T-R55L-G79A-E92Q de la protéine Tat

<400> 89
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 90
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant C27S-K51T-R55L-K89L-E92Q de la protéine Tat

<400> 90

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 91
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant C27S-K51T-R57L-G79A-K89L de la protéine Tat

<400> 91

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 92
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant C27S-K51T-R57L-G79A-E92Q de la protéine Tat

<400> 92

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 93
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant C27S-K51T-R57L-K89L-E92Q de la protéine Tat

<400> 93

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Thr Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 94
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R52L-R55L-R57L-G79A de la protéine Tat

<400> 94
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Leu Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Asp
 65 70 75
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 95
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R52L-R55L-R57L-K89L de la protéine Tat

<400> 95
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Leu Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 96
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R52L-R55L-R57L-E92Q de la protéine Tat

<400> 96
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 97
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R52L-R55L-G79A-K89L de la protéine Tat

<400> 97
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Leu Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 98
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R52L-R55L-G79A-E92Q de la protéine Tat

<400> 98
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Leu Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 99
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R52L-R55L-K89L-E92Q de la protéine Tat

<400> 99
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Leu Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 100
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R52L-R57L-G79A-K89L de la protéine Tat

<400> 100
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 101
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R52L-R57L-G79A-E92Q de la protéine Tat

<400> 101
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 102
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R52L-R57L-K89L-E92Q de la protéine Tat

<400> 102
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 103
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R52L-G79A-K89L-E92Q de la protéine Tat

<400> 103
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Leu Arg Gln Arg Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<220>
<223> mutant C27S-R55L-R57L-G79A-K89L de la protéine Tat

i

```
<210> 105
<211> 101
<212> PRT
<213> séquence artificielle
```

<220>
<223> mutant C27S-R55L-R57L-G79A-E92Q de la protéine Tat

```

<400>      105
Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
1              5              10              15
Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
                20              25              30
His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
                35              40              45
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
                50              55              60
His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
65              70              75              80
Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
                85              90              95
Thr Asp Pro Val Asp
                100

```

<210> 106
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R55L-R57L-K89L-E92Q de la protéine Tat

<400> 106
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 107
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> mutant C27S-R55L-G79A-K89L-E92Q de la protéine Tat

<400> 107
 Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Leu Arg Arg Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60
 His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val Asp
 100

<210> 108
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> séquence artificielle

<220>

<223> mutant C27S-R57L-G79A-K89L-E92Q de la protéine Tat

<400> 108

Met Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Ser Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

~~His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly~~
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Leu Ser Pro Gln Asp Ser Glu Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Ala Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Leu Lys Val Gln Arg Glu Thr Glu
 85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
 100

1

2

1



reçue le 31/01/02

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UNITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11235*02

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1./2
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 W / 26039

Vos références pour ce dossier (facultatif)		IFB 01 CE BIO MTAT	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0200315	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
MUTANTS DE LA PROTEINE TAT DU VIRUS VIH-1			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
BIOMERIEUX SA 376, Chemin de l'Orme F-69280 MARCY-L'ETOILE, France			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		GUILLON	
Prénoms		Christophe	
Adresse	Rue	161, rue du 4 août 1789	
	Code postal et ville	69100	VILLEURBANNE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		CHEDAL-BORNU	
Prénoms		Aurélien	
Adresse	Rue	50, route du Viéran	
	Code postal et ville	74370	METZ-TESSY
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		VERRIER	
Prénoms		Bernard	
Adresse	Rue	Chemin du Granit, La Pavière	
	Code postal et ville	69440	MORNAND
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 11 janvier 2002-01-10 Chantal Grosset-Fournier – Mandataire 422.5/PP112 	

a loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Le garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

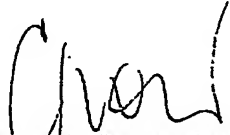
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2 / 2.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260890

Vos références pour ce dossier (facultatif)		IFB 01 AC BIO MTAT	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0200319	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
MUTANTS DE LA PROTEINE TAT DU VIRUS VIH-1			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
BIOMERIEUX SA 376, Chemin de l'Orme F-69280 MARCY-L'ETOILE, France			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		MANDRAND	
Prénoms		Bernard	
Adresse	Rue	21, rue de la Doua	
	Code postal et ville	69100	VILLEURBANNE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 11 janvier 2002 Chantal Grosset-Fournier – Mandataire 422.5/PP112 	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☒ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.